

Aus dem Med. Zentrum für Operative Medizin

Klinik für Neurochirurgie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Christopher Nimsky
des Fachbereichs Medizin der
Philipps-Universität Marburg

**Hat intrathekal appliziertes Baclofen
(Lioresal®) einen neuroprotektiven
Effekt im 4-Gefäßverschlussmodell
der Ratte?**

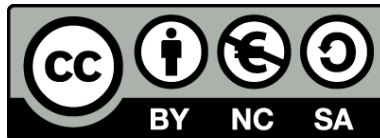
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg vorgelegt von

Florian Michael Stubenvoll
aus Idar-Oberstein

Marburg 2015

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Meiner Familie

1 EINLEITUNG.....	6
1.1 Ischämie Modelle bei Ratten.....	8
1.2 Schädigungsmuster globaler ischämischer zerebraler Läsionen.....	9
1.3 Biochemische Vorgänge periischämisch.....	11
1.4 Baclofen und der GABA-Rezeptor.....	14
1.4.1 Substanz.....	14
1.4.2 Pharmakokinetik.....	14
1.4.3 Der GABA-Rezeptor.....	15
1.5 Fragestellungen.....	16
2 MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Materialien.....	17
2.1.1 Tiere und Tierhaltung.....	17
2.1.2 Materialien für Globalischämie.....	17
2.1.3 Materialien für die stereotaktische Zielpunktbestimmung und für die Injektion.....	20
2.1.4 Materialien zur Messung von Vital- und Laborparametern.....	21
2.1.5 Materialien zur In-vivo-Fixierung des Rattenhirns.....	21
2.1.6 Materialien zur histologischen Aufarbeitung der Gehirne.....	22
2.1.7 Materialien zur Quantifizierung der hippocampalen Läsion.....	23
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Operationsvorbereitung.....	23
2.2.2 Durchführung der Globalischämie.....	25
2.2.2.1 Legen eines arteriellen Zuganges.....	25
2.2.2.2 Präparation der hirnersorgenden Arterien.....	28
2.2.2.3 Induktion der reversiblen zerebralen Globalischämie.....	32
2.2.3 Stereotaktische intrazerebroventrikuläre Applikation von Baclofen.....	33
2.2.3.1 Stereotaktische Zielpunktbestimmung bei der Ratte.....	33
2.2.3.2 Beschreibung der Applikationsvorrichtung.....	35
2.2.3.3 Applikation von Baclofen.....	35
2.2.4 Messung der Vital- und Laborparameter und Überwachung.....	36
2.2.5 In-vivo-Fixierung der Ratte.....	40
2.2.6 Mikroskopie des Gehirns.....	41
2.2.6.1 Durchführung der histologischen Aufarbeitung des Gehirns.....	41
2.2.6.2 Histologische Schnitte der Hippokampusregion.....	42
2.2.6.3 Säurefuchsin-Cölestinblau-Färbung.....	42
2.2.7 Quantifizierung der Läsion.....	46

2.2.8 Statistik.....	48
3 RESULTATE.....	49
3.1 Zellläsionen.....	49
3.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (Mean arterial blood pressure, MABP).....	55
3.3 Rektaltemperatur.....	72
3.4 Intrakranielle Temperatur.....	74
3.5 Blutglukosespiegel aus der Femoralarterie.....	76
3.6 Kohlendioxid-Partialdruck (pCO ₂).....	85
3.7 Sauerstoff-Partialdruck (pO ₂).....	93
3.8 pH.....	100
3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	103
4 DISKUSSION	105
4.1 Wahl der Versuchstiere.....	105
4.2 Operationstechnik.....	106
4.2.1 Anästhesie.....	106
4.2.2 Intraoperativer Blutverlust und Flüssigkeitshaushalt.....	106
4.2.3 Rektaltemperatur / Intrakranielle Temperatur.....	107
4.2.4 Glukosehaushalt.....	108
4.2.5 Blutgase.....	108
4.3 Wirkungsweise von Baclofen.....	111
4.4 Interpretation der Ergebnisse.....	112
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	115
6 LITERATURVERZEICHNIS, CHRONOLOGISCH.....	117
7 LITERATURVERZEICHNIS, ALPHABETISCH.....	125
8 ANHANG.....	132

<u>8.1 Abkürzungen.....</u>	<u>132</u>
<u>8.2 Danksagung.....</u>	<u>134</u>
<u>8.3 Akademische Lehrerinnen und Lehrer.....</u>	<u>136</u>

1 Einleitung

Baclofen wird als Lioresal® intrathekal im klinischen Gebrauch zur Therapie der spinalen und auch supraspinalen Spastik seit 1984 eingesetzt. Diese kann die Folge eines schweren Schädelhirntraumas, eines Tumors, einer Blutung, eines ischämischen Ereignisses oder einer Multiplen Sklerose im zentralen Nervensystem sein. Es ist wahrscheinlich, dass Baclofen ebenfalls einen analgetischen Effekt besitzt, zumindest jedoch scheint es bei supraspinalen Spastiken die autonomen Dysregulationen zu verbessern [1].

Es konnte beobachtet werden, dass Patienten, denen dieses Pharmakon über eine implantierbare Medikamentenpumpe intrathekal appliziert wurde, in einer Weise profitierten, die über die Spasmolyse oder Analgesie hinausgeht: Neben einer Reduzierung der Spastik sowie der durch die Spastik verursachten Schmerzen, war auch eine positive Beeinflussung vegetativer Regulationsstörungen zu verzeichnen [2]. Der Frage, ob Baclofen einen neuroprotektiven Effekt hat, ist bislang nur bei der systemischen Applikationsform nachgegangen worden. Daten zur intrathekalen Applikationsweise lassen sich vermissen [3].

Es soll ein Beitrag geleistet werden zu ergründen, ob Baclofen eine neuroprotektive Potenz bei intrathekalen Applikationen besitzt.

Diese Annahme ist nahe liegend, da Baclofen, als GABA_B-Agonist hemmend auf die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter, allen voran Glutamat, wirkt. Diese entstehen bei Schädigungen des zentralen Nervensystems sowie bei vegetativen Krisen. Im Rahmen der weiter unten erläuterten Exzitotoxizität kommt diesen Neurotransmittern eine große Bedeutung beim neuronalen Zelltod zu.

Aus Untersuchungen einer Habilitationsarbeit von Ralf Becker und einer Promotionsarbeit von Alexander Ludolph, die bei postischämischer

Applikation von 1,5µg Baclofen keinen Anhalt auf Wirksamkeit gefunden, und bei der präischämischen Applikation mit 1,5µg sogar auf Grund der Kardiodepression einen schädigenden Effekt beobachtet [4] haben, ergeben sich weitere Fragestellungen.

Die Überlegung ist nun, mit einer niedrigeren Dosierung präischämisch (1µg) die der Ischämie aufgesetzte zusätzlich schädigende Wirkung der Kardiodepression, die eine intranschämischen Minderperfusion hervorrufen kann, bis zu einem gewissen Grad zu vermindern, und postischämisch durch eine höhere Dosierung (2µg) doch noch einen neuroprotektiven Effekt zu demaskieren [4].

In einer Arbeit aus dem Jahre 1990 wurde bereits der Schluss gezogen, dass Baclofen, intraperitoneal appliziert, keinen neuroprotektiven Effekt habe: Unter der Annahme, dass eine präsynaptische Glutamatfreisetzung in den extrazellulären Raum und eine Aktivierung der rezeptorvermittelten Ca^{2+} -Kanäle am ischämieinduzierten neuronalen Schaden beteiligt seien - das ist eine These der *Exzitotoxizitätstheorie*, die später weiter ausgeführt wird - wurde der GABA_B-Rezeptor-Agonist Baclofen als potenziell wirksames Pharmakon untersucht, welches inhibierend auf den Ca^{2+} -Influx wirkt. Es wurden 10mg/kg KG Baclofen 1 Stunde vor und 30 bis 60 Minuten nach einem 20-minütigen Viergefäßverschluss bei 64 Wistar-Ratten i. p. appliziert und die Mortalität, das Arbeitsgedächtnis und der hippocampale resp. kortikale Zellschaden nachuntersucht. Bei dieser prä- und postischämischen intraperitonealen und somit systemischen Applikation hat sich kein Benefit durch Baclofen nachweisen lassen [5]. Die vorliegende Arbeit versucht jedoch zu zeigen, dass beide Applikationszeitpunkte getrennt voneinander zu betrachten sind. Die Verläufe der Blutdruckkurven, die maßgeblich von der Baclofenapplikation beeinflusst werden, spielen möglicherweise eine

erhebliche Rolle bei der Evaluation der Wirksamkeiten des Pharmakons.

Außerdem wird hier die intrathekale im Gegensatz zur systemischen Applikation gewählt.

1.1 Ischämiemodelle bei Ratten

Bei den meisten kleinen Labortieren, so auch bei den hier verwendeten männlichen Wistar-Ratten, ist der unilaterale Verschluss einer A. carotis communis wenig schädlich [6].

Bereits 1979 beschreiben Pulsinelli und Brierley ein Viergefäßverschlussmodell zur globalen Ischämie, bei dem die Vertebralarterien in Höhe des ersten Halswirbelkörpers mittels eines Elektrokauters durch die Foramina alaria permanent unterbrochen werden und die Aa. carotides communes temporär durch einen Klip verschlossen werden [7].

Der sechs Jahre später vorgestellte Dreigefäßverschluss, bei dem das hintere Stromgebiet weiter kranial in Höhe der A. basilaris unterbrochen wird, vermag keine Verbesserung gegenüber dem Viergefäßverschlussmodell aufzuzeigen [8].

1988 erweitert Pulsinelli die Beschreibung seines Viergefäßverschlussmodells auf die Beherrschung von Kollateralkreisläufen. Diese stellen einen nicht zu unterschätzenden Einfluss bei der globalen zerebralen Ischämie dar, können sie doch die totale Flussunterbrechung bis zu einem ungewissen Grade vereiteln [9]. Denkbar wäre eine Untersuchung des Restflusses mit einem transkraniellen Laserdopplerverfahren.

In einem 1989 veröffentlichten Review werden die verschiedenen Ischämiemodelle bei Nagetieren einander gegenübergestellt, wobei die Indikationen sehr gewissenhaft abgegrenzt sind [10].

So eignet sich zur Untersuchung fokaler ischämischer Läsionen ein Verschlussmodell der A. cerebri media besser, bei dem ein Nylon-Faden einer bestimmten Dicke intraluminal vorgeschoben wird und das Gefäß distal vom Fadenende obturiert [11].

1991 wird eine radikale Methode der kompletten zerebralen Ischämie beschrieben: Durch den dritten Interkostalraum wird ein Instrument zur kompletten Abklemmung des kardialen Gefäßstammes am aufsteigenden Aortenbogen direkt über der Aortenwurzel eingeführt. Die Letalität nach kardialer Reanimation von 48% ist allerdings inakzeptabel hoch [12].

Als den beschriebenen Modellen zur Erzeugung einer globalen zerebralen Ischämie überlegen stellt sich unserer Auffassung nach das von Ludolph dar, welches im Methodenteil ausführlich besprochen wird [13]. Der Verschluss beider Aa. vertebrales erfolgt hierbei von ventral unter Sicht und wird als sichere Variante erachtet.

1.2 Schädigungsmuster globaler ischämischer zerebraler Läsionen

Einer ganzen Reihe von Untersuchungen liegt eine wie auch immer evozierte globale zerebrale Ischämie zu Grunde. Dabei können besonders die Pyramidenzellen des CA-1-Bandes des Hippokampus studiert werden, die bei der Läsion den größten Schaden davontragen. Lichtmikroskopisch imponiert der Verlust von Pyramidenzellen, der durch schlichtes Auszählen quantitativ recht genau erfasst werden kann [14,15].

Über das Wesen dieser Schädigung beim mongolischen Gerbil hat Kirino in den 1980er Jahren ausführlich gearbeitet.

Dort unterscheidet er zwischen drei unterschiedlichen Formen der Schädigung in der CA1-, der CA2- und der CA4-Region: Die Schädigung

in der CA4-Region erfolgt rasch, d. h. innerhalb weniger Stunden, und entspricht der ischämischen Zellveränderung auf Grund des Versagens der Ionenpumpe in der Plasmamembran, also Ballonierung und Schwellung, auch Onkose genannt [16]. Langsamer geht die Schädigung im CA2-Band vonstatten: Hier spricht Kirino von sog. „reaktiven ischämischen Veränderungen“ [17].

Am längsten jedoch dauern die Veränderungen in der CA1-Region: Lichtmikroskopisch werden sie frühestens am zweiten Tage nach der Ischämie auffällig, und die elektronenmikroskopische Analyse ergibt eine „lamelläre Reihung proliferierter Zisternen des endoplasmatischen Retikulums“. Diese Form des Zelltodes wird damals „verzögerter neuronaler Zelltod“ genannt [17].

Die Natur dieses „*delayed neuronal death (DND)*“ wird auch zwei Jahre später noch verkannt und kann nur deskriptiv erfasst werden [18]. Wiederum zwei Jahre später gelingt der Nachweis der partiellen Reversibilität durch Applikation von Pentobarbital [19].

Heute gilt als weitgehend gesichert, dass es sich bei dieser Form des „verzögerten neuronalen Zelltodes“ um Apoptose handelt [20, 21], und gelelektrophoretisch sind DNA-Fragmentationen feststellbar [22-24], wenngleich in einer Arbeit der elektronenmikroskopische Nachweis gegen die Apoptose als Mechanismus des neuronalen Zelltodes geführt wird [25].

Weitere Arbeiten zeigen, dass ischämieinduzierte Nekrosen von Apoptosen begleitet sind [16, 26].

Tatsächlich zeigt die Empirie, dass die CA1-Region diejenige ist, die am sensibelsten, sprich nach kürzester Ischämiezeit, auf ischämischen Stress durch Zelltod reagiert: In Abhängigkeit von der Zeit der Ischämie werden in aufsteigender Reihenfolge der Widerstandsfähigkeit zunächst die Pyramidenzellen der CA1- und CA4-Region des Hippokampus, dann die Neurone des Subikulums,

neokortikale Zellen und schließlich Neurone der CA3-Region und des Kaudoputamens affiziert, nach sehr langen Ischämiezeiten schließlich wird auch der zerebrale Kortex, dort vor allem die superolaterale Konvexität, betroffen [27].

Unternimmt man den Versuch, den Schaden genau zu analysieren, welcher den Neuronen unter hypoxisch-ischämischem Stress widerfährt, so kann man direkt nach der Ischämie die vollständig reversible Ausprägung von Mikrovakuolen beobachten. Im späteren Verlauf tritt eine irreversible ödematöse Zellveränderung auf, die gar zum Bersten der Zellmembran führen kann [28].

Einen maßgeblichen Beitrag zur Beantwortung der Frage des lichtmikroskopisch sichtbaren Schadens leistet Mennel mit seiner Arbeit „Morphologie des Gewebes Schadens infolge experimenteller zerebraler Ischämie bei der Ratte“: Verschließt man bei der Ratte beide Karotiden permanent über einen Zeitraum von einer, zwei oder drei Wochen, so treten Territorialinfarkte auf über die Stufen von nekrotischen, blassen Gewebearealen bis hin zu ischämischen Zysten. Am Randgebiet kann eine astrogliale Reaktion beobachtet werden.

Beim zehnminütigen Karotisverschluss mit systemischer Hypotonie ist am zweiten postischämischen Tage kaum eine Veränderung feststellbar, der „verzögerte neuronale Tod“, also die Apoptose, wie man heute weiß, tritt dann am sechsten Tage auf [29].

1.3 Biochemische Vorgänge periischämisch

Um die Kausalzusammenhänge ischämischer Läsionen zu verstehen, sind Untersuchungen auf biochemischer Ebene vorgenommen worden. Mithilfe des sogenannten Mikrodialyseverfahrens können prä-, intra- und postischämisch die Konzentrationen von Aminosäuren, eben den Neurotransmittern, gemessen werden.

Bereits 1984 kann gezeigt werden, dass eine transiente zerebrale Ischämie durchaus einen Effekt auf die extrazelluläre Transmitterkonzentration hat: So ist der Anteil an Glutamat um das Achtfache, der an Aspartat um das Dreifache während der Ischämie erhöht. Aus dieser Beobachtung heraus entsteht die Annahme, dass der erhöhte Glutamat- und Aspartatspiegel an der durch die Ischämie induzierten neuronalen Schädigung beteiligt sein könnten [30]. In die Literatur findet dieses Phänomen Eingang unter dem Begriff der Exzitotoxizität [31-34].

Eine weitere bedeutende Rolle bei der ischämischen Schädigung scheinen Kalziumionen, Ca^{2+} , zu spielen: 1988 führt eine Forschergruppe um Benveniste am neuropathologischen Institut der Universität zu Kopenhagen eine „Schafferotomie“ durch: Die SCHAFER-Kollateralen, die eine Verbindung zwischen der CA1- und CA3-Region des Hippokampus darstellen, werden dabei zerstört. Diese Deafferentation hat zur Folge, dass die ischämische Nervenzellzerstörung in CA1 vollständig ausbleibt, während in der Kontrollgruppe die Schädigung innerhalb von 2-3 Tagen manifest wird. Um die Rolle des intrazellulären Ca^{2+} einschätzen zu können, wird dann das interstitielle Ca^{2+} betrachtet – dieses nimmt in der Kontrollgruppe etwa 100 Sekunden nach Beginn der Ischämie um 90% ab, während in der Schafferotomie-Gruppe keine Veränderung des interstitiellen Ca^{2+} zu verzeichnen ist. Damit liegt es sehr nahe, dass der intraintrazelluläre Ca^{2+} -Influx für die neuronale ischämische Schädigung bedeutsam ist [28, 35, 36]. Mehr noch, die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} scheint direkt mit der Erhöhung des Neurotransmitters Glutamat zusammenzuhängen, dessen Konzentration während der Ischämie unter normalen Bedingungen um das Sechsfache zunimmt, während die mit einer Schafferotomie vorbehandelten Tiere nur eine 1,6-fache Zunahme aufweisen [37].

Was aber geschieht nun mit den geschädigten Neuronen? Diese Frage lässt sich auf Zellorganellebene beantworten, wo das lysosomale Abbausystem (Degradation) zum Tragen kommt.

Die mit unterschiedlichen Hydrolasen (z. B. Saure Phosphatase, Glukuronidase, Sulfatase, Ribonuklease, Kollagenase) gefüllten primären Lysosomen können rupturieren, so dass die freiwerdenden hydrolytischen Enzyme die Zelle an ihrem Lebensende auflösen („*end-stage cellular dissolution*“) oder aber über den Weg der Phagozytose den zellulären Debris abräumen [38].

Apoptotische Zellen und deren Fragmente haben an ihrer Oberfläche Markermoleküle, die umliegende Zellen und Phagozyten zum Einsatz kommen lassen. So werden die Residuen zuverlässig und restlos entfernt, und es kommt erst gar nicht zu einer inflammatorischen Reaktion [39].

Ergebnisse einer Arbeit aus dem Jahre 1994 legen nahe, dass in exzitotoxisch geschädigten Neuronen die Expression des Genproduktes des Tumor-Suppressor-Genes p53 erhöht ist: Gemessen wurde der Spiegel der p53-mRNA nach Schädigung durch das Glutamat-Analogon Kainat. Dieser Befund galt auch für Neurone, deren DNA fragmentiert war. Damit ist davon auszugehen, dass in ischämischen Arealen die apoptotische Kaskade eingeleitet wird [40].

Zuletzt soll die elektrophysiologische Ebene betrachtet werden, die einen weiteren Aufschluss über die biochemischen Vorgänge periischämisch gibt.

Etwa drei Minuten nach dem Einsetzen einer fünfminütigen fokalen Frontalischämie ist eine rasche Depolarisation des Membranpotenzials der CA1-Pyramidenzellen bis auf -20mV zu verzeichnen. Die Amplitude dieser Depolarisation ist umso größer, je schwerer die Ischämie ist, und sie tritt umso früher auf, je höher die intrazerebrale Temperatur ist [41].

1.4 Baclofen und der GABA-Rezeptor

1.4.1 Substanz

Baclofen ist das beta-p-Chlorophenyl-Derivat von GABA und somit ein selektiver GABA_B-Agonist, der die präsynaptische Glutamatfreisetzung *in vivo* inhibiert [42-45].

Die biologische Aktivität des sowohl als d- wie auch als l-Enantiomers vorkommenden Baclofens geht in der Hauptsache von der linksdrehenden Form aus [46], die 180fach potenter ist als die rechtsdrehende [47].

Wiederholte Baclofen-Applikation evoziert eine Toleranz, deren Ursache als noch nicht genau geklärt angesehen werden muss, recht gewiss jedoch steht nicht der Mechanismus der Rezeptor-Down-Regulation dahinter [48].

Bedeutsam für das Experiment ist die Auslösung einer Hypothermie, die eine maximale Ausprägung nach einer Stunde bei subkutaner Applikation erfährt [48].

1.4.2 Pharmakokinetik

Baclofen wird bei enteraler Applikation zu mehr als 80-90% im Magen-Darm-Trakt resorbiert und renal eliminiert. Da es die Blut-Hirn-Schranke nur unter größten Mühen penetriert, betragen die Hirngewebemengen von Baclofen nur etwa 10% des Serum-Spiegels [49].

1984 wird daher eine intrathekale Applikation vorgeschlagen, die eine höhere Verfügbarkeit und Wirksamkeit verspricht [50].

1.4.3 Der GABA-Rezeptor

Glutamat ist der bedeutendste exzitatorische Transmitter im zentralen Nervensystem. Die γ -Aminobuttersäure hingegen (γ -aminobutyric acid, GABA) ist hier der wichtigste inhibierende Transmitter. Ebenso wie Glutamat zur Entfaltung seiner Wirkung des Glutamat-Rezeptors (GluR) bedarf, ist für GABA ein Rezeptor bzw., wie man heute weiß, eine Rezeptorfamilie vonnöten: Bei Unterscheidung von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren spielt Baclofen eine bedeutsame Rolle. Es ist ein neuer GABA-Rezeptor gefunden worden, der von bewährten GABA-Antagonisten wie Bicucullin oder GABA-Mimetika wie 3-Amino-Propansulphonat (3-APS, Homotaurin) oder (3SR, 4RS)-3,4-Epoxipiperidin-4-Carboxylat (Isoguvacinoxid) unberührt bleibt. Man definiert den Bicucullin-empfindlichen Rezeptor als GABA_A-, den Baclofen-empfindlichen als GABA_B-Rezeptor (GABA_AR und GABA_BR). Es handelt sich um ein Heterodimer, das aus zwei Untereinheiten besteht mit 7 transmembranären Domänen, die am Karboxyl-Ende miteinander verbunden sind. Die offenliegenden Ligandenbindungsdomänen liegen an der extrazellulären Membranoberfläche bei R1 und R2. Durch Aktivierung des Heterodimers wird eine Adenylatzyklase G-Protein-gekoppelt aktiviert, durch welche die K⁺- und Ca²⁺-Leitfähigkeit beeinflusst wird [51, 52].

Die Verteilung des GABA_BR erstreckt sich neben dem ZNS auch auf periphere Organe und Gewebe [53]. Die höchste Dichte findet sich in der angegebenen Reihenfolge in den thalamischen Kerngebieten, dem Stratum moleculare des Zerebellum, dem zerebralen Kortex, dem Nucleus interpeduncularis und dem Hinterhorn des Rückenmarks [54-56]. Mit den Dosierungen aus vorangegangenen Studien und den Begründungen für das Versagen der Wirksamkeit ergeben sich nun die unten aufgeführten Fragestellungen.

1.5 Fragestellungen

- 1) Ist $1\mu\text{g}$ Baclofen, gelöst in $5\mu\text{l}$ NaCl, das 30 Minuten *vor* einer zehnminütigen Globalischämie über einen Zeitraum von fünf Minuten in den rechten Seitenventrikel einer 250g schweren männlichen Wistar-Ratte appliziert wird, in der Lage, die Zahl der nach einer Woche Überlebenszeit geschädigten Neurone im CA1- bis CA3-Band des Hippokampus zu vermindern?
- 2) Sind $2\mu\text{g}$ Baclofen, gelöst in $5\mu\text{l}$ NaCl, die 30 Minuten *nach* einer zehnminütigen Globalischämie über einen Zeitraum von fünf Minuten in den rechten Seitenventrikel einer 250g schweren Wistar-Ratte appliziert werden, in der Lage, die Zahl der nach einer Woche Überlebenszeit geschädigten Neurone im CA1- bis CA3-Band des Hippokampus zu vermindern?

In der vorliegenden Arbeit sollen diese Fragen anhand experimenteller Untersuchungen mit einer statistischen Auswertung beantwortet werden.

2 Material und Methoden

In einem Ischämiemodell soll Baclofen intrathekal appliziert werden.

Es wird eine zehnminütige reversible zerebrale Globalischämie durch einen Vier-Gefäß-Verschluss (4-vessel occlusion model, 4VOM) herbeigeführt. Unter kontinuierlicher Überwachung der Vitalparameter findet die Baclofenapplikation 30 Minuten vor bzw. 30 Minuten nach der Ischämie statt.

2.1 Materialien

2.1.1 Tiere und Tierhaltung

- Männliche Wistar-Ratten, Gewicht: 250 – 350g, Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland
- Käfige der Größe 42cm x 26cm x 19cm
- Futterpellets, Altromin[®], Lage, Deutschland

2.1.2 Materialien für Globalischämie

- Operationstisch für Kleintiere, Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
- Operationsmikroskop, Vergrößerung bis 16fach, OPMIMD, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Lichtquelle Xenon/Halogen, Superlux 300[®], Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Stativ, Contraves AG, Zürich, Schweiz
- Halothan-Vaporisateur, Vapor 19.3, Drägerwerk AG Lübeck, Deutschland
- Messröhrenblock für O₂ (bis 15l/min) und N₂O (bis 12l/min), Messer-Griesheim GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

- Druckminderer für 50l-Flaschen O₂ und N₂O, Präzicon[®], Greggersen, Deutschland
- N₂O (Stickoxidul pro narcosi), 50l, Messer-Griesheim GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
- O₂ (Medizinischer Sauerstoff), 50l, Messer-Griesheim GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
- Heizunterlage, Homeothermic Blanket System, 150 x 250mm², heizbar, mit elektronischem DC-Steuergerät und Rektalsonde für Ratten, Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
- Präparierschere, METZENBAUM, Technologietransfer Marburg, TTM, Deutschland
- Chirurgische Pinzette, ADSON, Technologietransfer Marburg, TTM, Deutschland
- Mikroschere Sensation, bajonettförmig, stumpf/stumpf, FM 140 R, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
- 2 Mikropinzetten, Spitzenbreite 0,15mm, FM 001 R, Aesculap, Tuttlingen
- Wundspreizer, WEITLANER, stumpf, BV 074, Aesculap, Tuttlingen
- Raspatorium nach DAVIS, FF 300, Aesculap, Tuttlingen
- Nadelhalter, DE BAKEY, BM 032 R, Aesculap, Tuttlingen
- Feine Arterienklemme, HALSTED-MOSQUITO, gebogen, BH 111 R, Aesculap, Tuttlingen
- 2 Gefäßklemmen, DE BAKEY, gerade, FB 352 R, Aesculap, Tuttlingen
- Aneurysma-Klip, YAŞARGIL, bajonettförmig, FT 727 T, Aesculap, Tuttlingen
- 2 Aneurysma-Klips, YAŞARGIL, FT 722 T, Aesculap, Tuttlingen

- Anlegezange für Klips, bajonettförmig, FT 402 T, Aesculap, Tuttlingen
- Mikronadelhalter, REILL, gebogen, FD 243 R, Aesculap, Tuttlingen
- Mikro-Knüpfpinzette, gebogen, FD 281 R, Aesculap, Tuttlingen
- Nerv- und Gefäßhäkchen, KRAYENBÜHL, FD 396 R, Aesculap, Tuttlingen
- Koagulationsgerät, Bipolarkoagulator tb 50, Aesculap, Tuttlingen
- Bipolarpinzette, bajonettförmig, GK 764 R, Aesculap, Tuttlingen
- Dreiwegehahn, Discofix[®], B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Katheter mit Flügeln, Introcan-W[®], 24G (0,7mm x 19mm), B. Braun, Melsungen
- Einmalspritze, 5ml, B. Braun, Melsungen
- Einmalspritze, 1ml, Monoject, Sherwood Medical, Northern Ireland
- NaCl, 500ml, B. Braun, Melsungen
- Heparin, Liquemin[®] N 25.000, 400I.E./ml, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach – Wyhlen, Deutschland
- Lidocainhydrochlorid 2%, Xylocain[®], Astra, Wedel, Deutschland
- Dexpanthenol, Bepanthen[®]Roche, 5g, Augen- und Nasensalbe, Hoffmann–La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
- Geflochtenes chirurgisches Nahtmaterial, resorbierbar, 4/0, Vicryl[®], Ethicon, Norderstedt, Deutschland
- Geflochtenes chirurgisches Nahtmaterial, resorbierbar, 6/0, Vicryl[®], Ethicon, Norderstedt, Deutschland
- Monofiles, chirurgisches Nahtmaterial, nicht resorbierbar, 10/0, Ethilon[®], Ethicon, Norderstedt
- Medizinisches Pflaster, 3M Health Care, Durapore, St. Paul, U.S.A.

- Kompressen, 7,5 x 7,5cm², Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
- Wattekügelchen, 1,5g, Größe 000, Roeko, Langenau, Deutschland
- Puderfreier Untersuchungshandschuh in OP-Handschuhqualität, Biogel®-Diagnostic, Regent Medical, Boxbourne, UK
- Watteträger
- TempControl I mit Nadelsonde und 100W-Infrarotlampe, Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg vor der Höhe

2.1.3 Materialien für die stereotaktische Zielpunktbestimmung und für die Injektion

- Einmalskalpell, Gr. 15, Feather, Japan
- H₂O₂ 3%, Apotheke der Philipps-Universität, Marburg, Deutschland
- Baclofen, Lioresal® intrathecal, 10mg/5ml, Novartis DuPont, Bad Homburg
- Polyethylenschlauch (ID 0,58mm / AD 0,96mm), Portex Polythene Tubing, SIMS Portex, Großbritannien
- Pipettenspitzenauszieher, „Needle Pipette Puller“, Model 750, David Kopf Instruments, Tujunga, Kalifornien
- Glaskapillaren (ID 0,6mm / AD 1,0mm)
- Kanülenschaft ohne Luer Lock, 24 GA1, 0,55mm x 25mm, Becton Dickinson, Drogheda, Irland
- Präzisionsspritze, 1,0ml, Exmire Microsyringe, Ito Corporation, Fuji, Japan

- Spritzenpumpe, Univentor High Precision Instruments 802 Syringe Pump, Bulebel Industrial Estate, Zejtun, Malaga, Spanien
- Stereotaxiegestell, David Kopf Instruments, Tujunga, Kalifornien
- Elektrobohrer Minimot 40 (20.000U/min), 40W, Durchmesser des Bohraufsatzes: 0,7mm, Proxxon, Deutschland
- Fremdkörperheber, PLANGE, Storz Instruments, Bausch & Lomb, Heidelberg, Deutschland
- Knochenwachs, Lukens, Großbritannien

2.1.4 Materialien zur Messung von Vital- und Laborparametern

- Blutdruckmessmodul mit Registrierteil, Hellige GmbH, Freiburg im Breisgau, Deutschland
- Glucometer Elite[®] mit Teststreifen, Bayer Diagnostics, Leverkusen, Deutschland

2.1.5 Materialien zur In-vivo-Fixierung des Rattenhirns

- Rollerpumpe, Watson-Marlow Bredel Pumps, Model 323, Falmouth Cornwall, Großbritannien
- NaCl, 500ml, B. Braun, Melsungen
- Paraformaldehyd in PBS-Puffer (phosphate buffered saline), 500ml
- Kleintierguillotine, Eigenbau
- Irisschere, Technologietransfer Marburg, TTM
- Feine Arterienklemme, HALSTED-MOSQUITO, BH 120 R, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
- Chirurgische Pinzette, ED 561, Aesculap, Tuttlingen
- Chirurgische Pinzette, ED 557, Aesculap, Tuttlingen

- Schere, gebogen, BC 423 R, Aesculap, Tuttlingen
- Spatel zur Mobilisation des Hirns, Laborbedarf Kobe, Marburg
- Bulldog-Klemme Technologietransfer Marburg, TTM
- Bassin, 30 x 18 x 6 cm³
- Reagenzglasständer, Laborbedarf Kobe, Marburg

2.1.6 Materialien zur histologischen Aufarbeitung der Gehirne

- Wärmeschrank, Forma Scientific, Model 3156, water-jacketed incubator, Marietta, Ohio, U.S.A.
- Paraffin, schüttfähig, für die Histologie, Erstarrungspunkt ca. 56° - 58°C, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Paraffin, en bloc, Schmelzpunkt ca. 54°C, Merck KGaA, Darmstadt
- Schneidevorrichtung für Gehirne, Eigenbau, freundliche Leihgabe der Abteilung für Neuropathologie der Philipps-Universität, Marburg
- Ethanol, 80%, Apotheke der Philipps-Universität, Marburg
- Ethanol, 96%, Apotheke der Philipps-Universität, Marburg
- Isopropanol, Riedel-de Haën[®], Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
- Xylol, Riedel-de Haën[®], Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
- Schlittenmikrotom, Typ 1208, Leitz, Wetzlar, Deutschland

Färbungen:

- AmFe (Ammoniumeisensulfat), Riedel-de Haën[®]
- Aqua dest, Riedel-de Haën[®]
- HCl (37%), Riedel-de Haën[®]

- Cölestinblau, Riedel-de Haën®
- Säurefuchsin, Riedel-de Haën®
- Eisessig, Riedel-de Haën®

2.1.7 Materialien zur Quantifizierung der hippokampalen Läsion

- Lichtmikroskop, Carl Zeiss, Jena, Vergrößerung 200-fach
- Fadenokular mit Zählkammern, 20mm, Carl Zeiss, Jena
- Handzählgerät, Laborbedarf Kobe, Marburg

2.2 Methoden

2.2.1 Operationsvorbereitung

Bei dieser tierexperimentellen Studie werden männliche Wistar-Ratten der Firma Harlan-Winkelmann verwendet (siehe Abb. 1).



Abb. 1: Vier männliche Wistar-Ratten, passager in einem geöffneten Käfig, mit Rohrstück zur Ablenkung und zum Zeitvertreib

Eine unabhängige tierethische Kommission hat, fußend auf einem Tierversuchsantrag, die Notwendigkeit der Verwendung dieser Tiere geprüft. Alle beschriebenen Prozeduren werden in strikter Übereinstimmung mit den universitätsinternen Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

Die Haltung erfolgt unter konstanten klimatisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von $23 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$. Der Hell-Dunkel-Rhythmus beträgt 12

Stunden, in den Käfigen befinden sich maximal vier Tiere. Am Tage vor dem Eingriff wird ein 250g bis höchstens 350g schweres Versuchstier bei freiem Zugang zu Trinkwasser von Futter ferngehalten (siehe Abb. 2).



Abb. 2: Ratte auf der digitalen Waage

Vom Käfig wird das Tier behutsam in ein 10cm x 15cm x 20cm großes Behältnis verbracht, wo es mit einem Gemisch von Stickoxidul/Sauerstoff (2:1) und 4% Halothan präanarkotisiert wird. Die Anästhesie wird durch das Ausbleiben einer Reaktion auf einen Schmerzreiz im Interdigitalraum getestet (siehe Abb. 3).

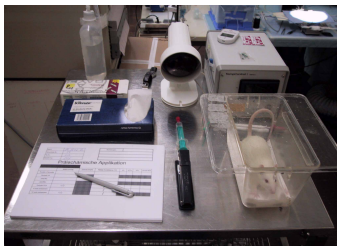


Abb. 3: Teil des Equipments mit Präanarkotisierungsgefäß vorne rechts im Bild

Sodann wird das Versuchstier auf dem Operationstisch an den Extremitäten fixiert (siehe Abb. 4 und Abb. 5).



Abb. 4: Versuchstier auf dem OP-Tisch mit Heizdecke, daneben Mikroinstrumente

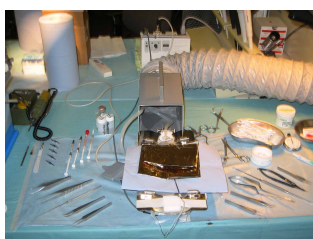


Abb. 5: Mikrochirurgischer Arbeitsplatz

Die Narkose wird aufrechterhalten durch ein Inhalationsnarkosegasgemisch von Stickoxidul/Sauerstoff (2:1) und Halothan (1,5%) (siehe Abb. 6).



Abb. 6: Stickoxidul und Sauerstoff in Flaschen mit Messröhrenblock, links Daneben ein Halothanvaporisateur („Vapor“)

Durch eine Heizdecke, auf welcher das Tier liegt, kann die Körperkerntemperatur permanent auf $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten werden. Vermittels Rückkopplung über eine Rektalsonde wird in Abhängigkeit von der Temperatur Wärme über eine 50W Heizdecke appliziert, die sich zum Schutz des Tieres auf maximal auf eine Temperatur von 45°C aufheizt (siehe Abb. 7).



Abb. 7: Versuchstier auf der Heizdecke mit Rektalsonde zur Temperaturmessung

Die Kornea des Tieres wird mit reichlich Dexpanthenol-Salbe bedeckt und so vor Austrocknung und thermischer Läsion durch Wärmeeinstrahlung geschützt.

2.2.2 Durchführung der Globalischämie

2.2.2.1 Legen eines arteriellen Zuganges

Ein etwa 4cm langer inguinaler Parallelschnitt zum linken lateralen Rand des Musculus obliquus externus abdominis laterokaudal vom

Ligamentum inguinale eröffnet den Blick auf das Leistenband und die femoralen Leitungsbahnen. Dazu wird mit der Präparierschere nach METZENBAUM inzidiert und zunächst stumpf weit vorpräpariert und unterminiert, ehe der Schnitt gesetzt wird. Eventuelle Blutungen werden mit der Bipolarpinzette gestillt (siehe Abb. 8).

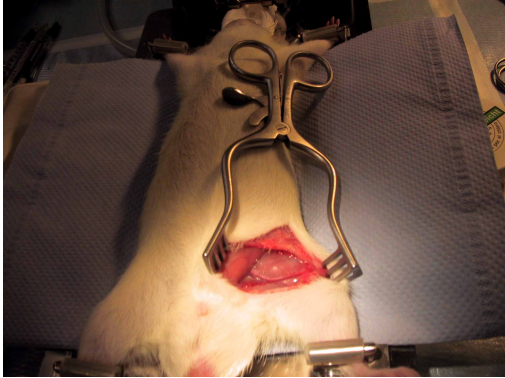


Abb. 8: Aufspreizen des Inguinal-Situs zur Darstellung der femoralen Leitungsbahnen

Mit dem Operationsmikroskop werden bei maximaler Vergrößerung die Femoralgefäße fokussiert (siehe Abb. 9). Mit den Mikropinzetten wird die A. femoralis (siehe Abb. 10) mobilisiert und möglichst weit distal mit einem Faden der Stärke 4/0 ligiert (siehe Abb. 11). Lokal appliziertes Lidocain blockiert die äußerst empfindlichen postganglionären sympathischen Fasern, hebt damit den Vasokonstriktorentonus an diesem Gefäßabschnitt auf und ermöglicht so leichter die Kanülierung mit dem Flügelkatheter (siehe Abb. 12).

Sodann wird das Lidocain mit einer Kompresse wieder weitestgehend entfernt, um bei der Punktion kein Einbringen des Lokalanästhetikums in den Kreislauf zu gestatten und eine systemische Wirkung zu verhindern (siehe Abb. 13).

Nach der Fixierung mit einem Faden der Stärke 4/0 sind Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks, Probenentnahme und Spülung möglich.

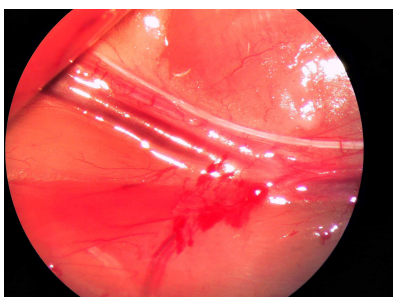


Abb. 9: Von medial (unten im Bild) nach lateral (oben): V., A. und N. femoralis. Lateral die Bauchwand (M. obliquus externus abdominis)

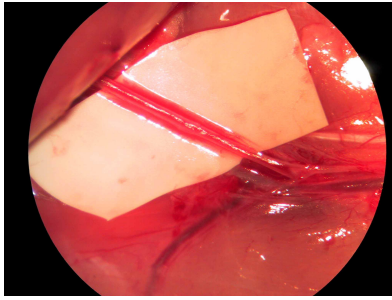


Abb. 10: A. femoralis, dilatiert mit Lidocain

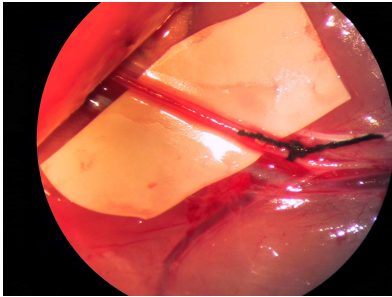


Abb. 11: A. femoralis, ligiert mit einem Faden der Stärke 4/0

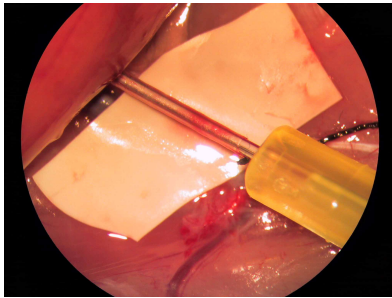


Abb. 12: Kanülierung mit 27G-Flügelkatheter

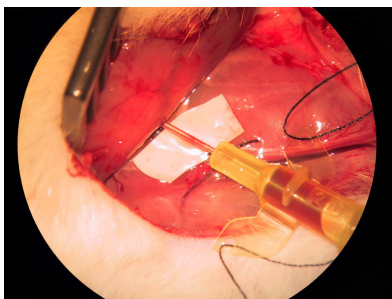


Abb. 13: Lidocain wurde weggetupft und der Flügelkatheter mit Haltefäden versehen

Nach Beendigung des Eingriffes wird die A. femoralis mit einem Klip temporär verschlossen und die Kanüle aus der Arterie entfernt. Die entstandene Leckage wird mit drei Stichen mit einem Faden der Stärke 10/0 evertierend genäht, um möglichst wenig thrombogene Kontaktfläche an der Intima entstehen zu lassen.

Übersteht die Naht die retrograde Perfusion nach Entfernen der distalen Ligatur, kann auch der proximale Klip entfernt werden.

Die Hautwunde wird mit einem Faden der Stärke 4/0 versorgt (siehe Abb. 14).



Abb. 14: Verschluss des Inguinalsinus am Ende der OP

2.2.2.2 Präparation der hirnversorgenden Arterien

Unter Zuhilfenahme des Operationsmikroskops bei mittlerer Vergrößerung wird mit der Präparierschere die Haut vom Os hyoideum bis zur Incisura jugularis eingeschnitten (siehe Abb. 15-17).

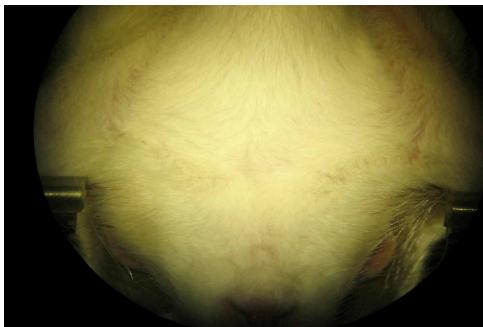


Abb. 15: Ventraler Zugangsbereich. Eine Rasur des Fells ist nicht erforderlich



Abb. 16: Inzision der Haut über Gl. thyroidea und Platysma

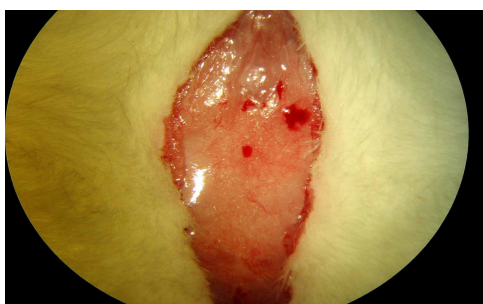


Abb. 17: Exposition der Gl. thyroidea

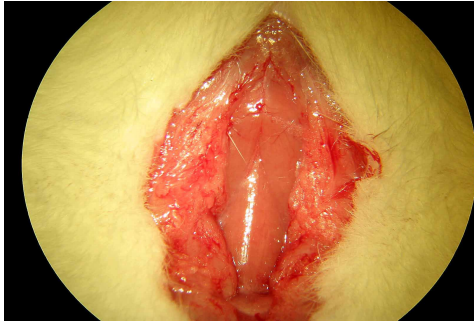


Abb. 18: Längsinzision der Schilddrüse,
Exposition der infrahyalen Muskulatur

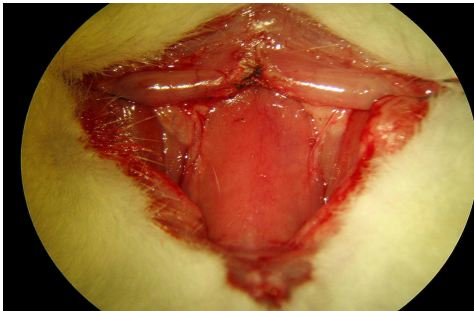


Abb. 19: Die Mm. sternohyoidei werden aus
dem Situs präpariert und mit Haltefäden auf
Distanz gebracht

Das darunterliegende Platysma wird, wo nötig, median mit der Mikropräparierschere gespalten. Ebenso werden die Lobi der gut vaskularisierten Glandula thyroidea in der Mittellinie, am Isthmus, gespalten, bis die infrahyale Muskulatur zum Vorschein kommt (Abb. 18). Die intermuskulären Adhäsionen der beiden Mm. sternomastoidei, wie sie bei der Ratte heißen, werden gelöst, dieselben mit dem Raspatorium lateral unterminiert und beidseits von den Mm. sternohyoidei getrennt.

Nun kommt bereits die Arteria carotis communis (CCA) zum Vorschein, die an der entscheidenden Stelle vom Venter superior musculi omohyoidei bedeckt wird, was die Darstellung etwas erschwert (siehe Abb. 19).

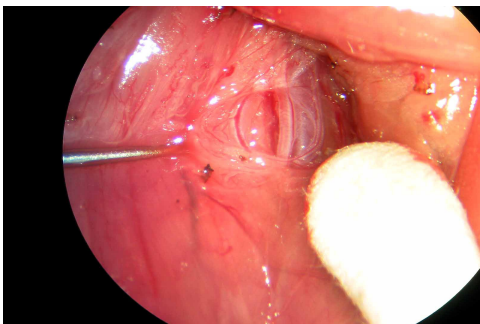


Abb. 20: In der Tiefe kommt lateral neben
dem N. vagus die A. carotis communis zur
Darstellung

Die folgenden Schritte werden bei maximaler Vergrößerung durchgeführt.

Die CCA (Abb. 20) wird beidseits aus der Gefäß-Nervenscheide mobilisiert und mit einem Vessel-Loop zur leichteren Auffindbarkeit versehen (siehe Abb. 21 und 22).

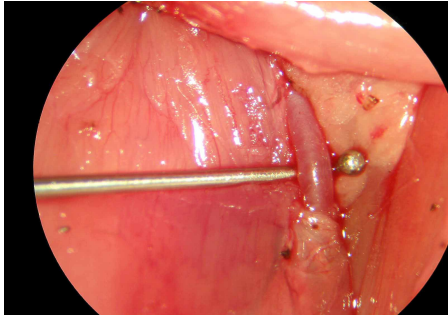


Abb. 21: Die CCA wird mobilisiert und hervorluxiert

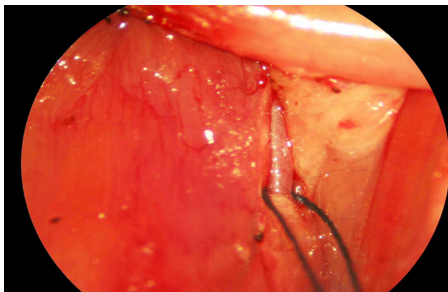


Abb. 22: Im nächsten Schritt wird die CCA mit einem Vessel-Loop markiert

Nun wird der Operationstisch kranial um 30° eleviert, die Optik des Mikroskops um 45° in der Longitudinalebene gekippt und medial der CCA mit den Mikropinzetten das Tuberculum anterius vertebrae cervicalis sextae als *Landmark* aufgesucht, klinisch kurz Processus caroticus genannt (siehe Abb. 23 und 24).

Das bei diesem Präparationsschritt immer wieder austretende Exsudat und auch das geringfügige Blut werden mit einem Q-Tip oder weiter in der Tiefe mit Wattekügelchen aufgenommen (siehe Abb. 25).

Die Arteria vertebralis, der ein Nerv vom sympathischen Grenzstrang ventral anliegt, wird dargestellt, wo sie kaudal des Processus caroticus in die Vertebra cervicalis VI eintritt (siehe Abb. 26).

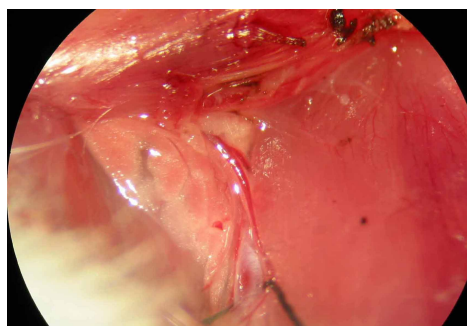


Abb. 23: In der Tiefe schimmert der Processus caroticus hindurch

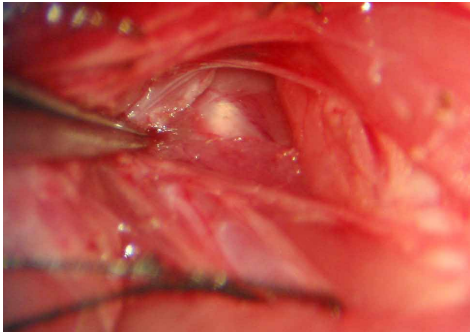


Abb. 24: Hier liegt nur noch eine dünne Muskelschicht darüber

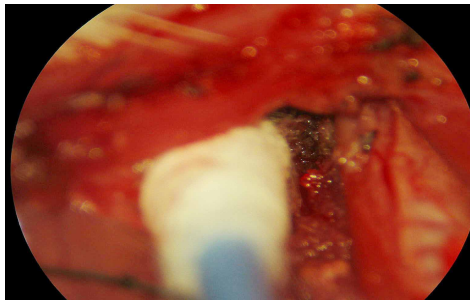


Abb. 25: Austretendes Exsudat wird aufgenommen und stumpf voranpräpariert

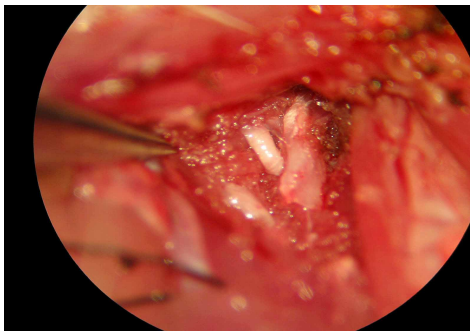


Abb. 26: Der siebte zervikale Spinalnerv kommt zur Darstellung

Im Weiteren werden die anatomischen Strukturen verdeutlicht.

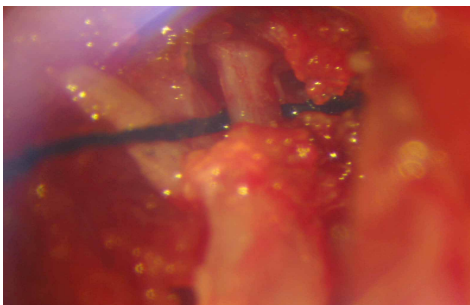


Abb. 27: Die Arteria vertebralis wird angeschlungen

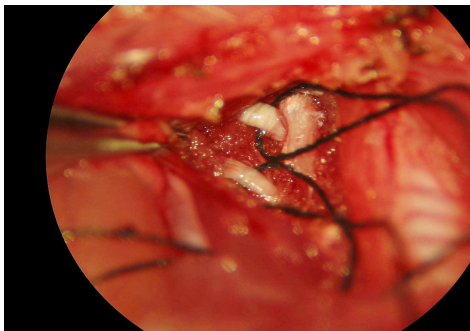


Abb. 28: Zusätzlich angeschlungen sind die CCA und zwei Spinalnerven

In einem derartig präparierten Situs ist eine Ligatur der bedeutendsten hirnversorgenden Arterien möglich.

2.2.2.3 Induktion der reversiblen zerebralen Globalischämie

Kurz vor der Eintrittsstelle der A. vertebralis in den sechsten Halswirbel wird mit der Anlegezange auf beiden Seiten ein Aneurysmaklip nach YAŞARGIL appliziert.

Dabei wird zunächst die linke, in der regelrechten Anatomie oft kleinere A. vertebralis okkludiert, danach die etwas größere rechte (siehe Abb. 29 und 30).



Abb. 29: Die A. vertebralis wird mit einem Titanklip passager komprimiert

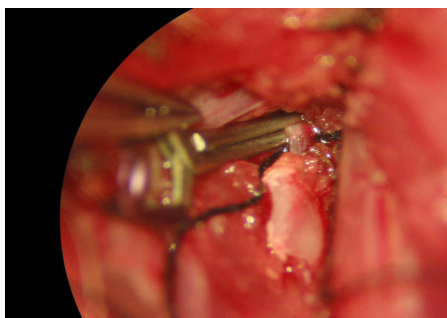


Abb. 30: YAŞARGIL-Klip im Situs

Die beiden CCA werden mit Gefäßklemmen nach DE BAKEY verschlossen (siehe Abb. 31).

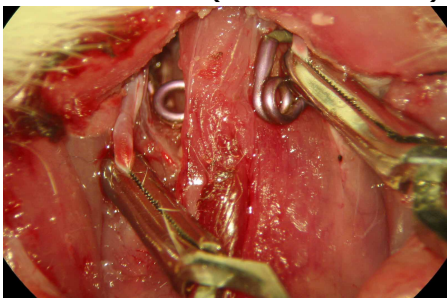


Abb. 31: Alle vier hirnversorgenden Arterien sind passager verschlossen



Abb. 32: Während der globalen Ischämie wird die Temperatur intrakraniell mit einer Infrarotlampe konstant gehalten, die einem Rückkoppelungsmechanismus unterliegt

Dieses verbesserte Verfahren des 4VOM hat Alexander Ludolph (2002) etabliert.

Während der zehnminütigen Ischämie wird die Temperatur unter der Kopfhaut von einer Sonde gemessen und mit einer seitlich angebrachten Rotlichtlampe über einen Rückkopplungsmechanismus konstant bei 37°C gehalten (siehe Abb. 32). Zum Schutz der Kornea wird auch hier Dexpanthenol-Salbe verwendet.

2.2.3 Stereotaktische intrazerebroventrikuläre Applikation von Baclofen

2.2.3.1 Stereotaktische Zielpunktbestimmung bei der Ratte

Die Methoden der Stereotaxie vermitteln die Möglichkeit, z. B. die Spitze einer in einen Halteapparat eingespannten Kanüle an jeden beliebigen Punkt in einem vorgegebenen dreidimensionalen Raum zu manövrieren.

Der Hirnatlas von Paxinos und Watson macht es möglich, einem jeden Punkt im Gehirn der Ratte drei Koordinaten zuzuordnen und ihn somit exakt räumlich zu definieren [59].

In diesem Atlas sind die anatomischen Daten von 120 Ratten gemittelt und beziehen sich entweder auf Abstände von der Interaurallinie oder vom Bregma.

Zur Zielpunktbestimmung wird die Ratte (250-350g) in einem Stereotaxierahmen so eingespannt, dass zwei Metallsporne, sog. Ohrpins, die in den Meatus acusticus externus eingeführt werden, das Kranium derart fixieren, dass der Schädel theoretisch frei um die Interaurallinie rotiert werden kann. Eine Schneidezahn-Stange, die palatinal am Gingivarand der beiden superioren Dentes incisivi

transversal angelegt wird, fixiert den Kopf der Ratte bis auf Bruchteile eines Millimeters.

Wenn die Ebene durch Bregma und Lambda waagrecht ist, gibt es eine 10mm darunter gelegene Parallelebene, die sich definiert durch die Interaurallinie und einen Punkt, der genau 3,3mm senkrecht über der Schneidezahn-Stange liegt.

Aus dem Atlas lässt sich die Entfernung des anzuvisierenden Punktes von der Interaurallinie bis auf 0,5mm rostral (Interaurallinie + x) bzw. dorsal (Interaurallinie - x) angeben. Dieser Koronarschnitt zeigt nun eine zweidimensionale Ebene. Der Punkt wird weiter definiert einerseits durch den lateralen Abstand von der Mittellinie und andererseits durch den superioren Abstand von der in der Interaurallinie liegenden Ebene. In der Praxis liegt ein Schlitten vor, der in alle drei Raumrichtungen auf einem Dummy, einem zweiten Stereotaxierahmen, beweglich ist. An diesem Mikromanipulator ist eine Kanüle fixiert - der Zeiger - welcher auf die Koordinaten (0/0/0) eingestellt ist. Dieser Punkt befindet sich exakt zwischen den beiden Metallspornen. Auf den Skalen des Dummies liest man nun die Koordinaten (a/b/c).

Dabei ist „a“ die anteriore (+) bzw. posteriore (-) Entfernung von der Interaurallinie, „b“ die superiore Entfernung von derselben und „c“ der rechtslaterale Abstand von der Mittellinie.

Der Punkt, der zur Baclofenapplikation aufgesucht werden soll, liegt in der Mitte des rechten Seitenventrikels und befindet sich 7,7mm vor der Interaurallinie, 6,5mm über ihr und 2,0mm lateral von der Mittellinie. Damit hat er die Koordinaten (a+7,7/b+6,5/c+2,0).

Genau diese Koordinaten werden auf das Stereotaxiegestell übertragen, in welches das Versuchstier eingespannt wird.

2.2.3.2 Beschreibung der Applikationsvorrichtung

Die Glaskapillaren werden in den Pipettenspitzenauszieher eingespannt und nach dem Ausziehen auf eine Länge von etwa 5cm gebracht. Mit einer Feile wird der Luer-Lock von der Kanüle abgetrennt. Der entstandene Kanülenschaft verbindet den etwa 50cm langen Polyethylenschlauch mit der Glaskapillare. Die Adaptation von Glaskapillare und Polyethylenschlauch an der Kanüle erfolgt mit Sekundenkleber.

Nun wird die Glaskapillare in den Schlitten des Stereotakten eingespannt.

Im Anschluss daran wird der Polyethylenschlauch mit einer Präzisionsspritze verbunden, die ihrerseits in die Spritzenpumpe eingespannt wird.

Baclofen als Injektionslösung wird auf eine Konzentration von $1\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ für die präischämische und $2\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ für die postischämische Applikation verdünnt, die Präzisionsspritze damit aufgefüllt. Pro Minute wird $1\mu\text{l}$ mit der Spritzenpumpe über die Injektionskanüle in den Seitenventrikel appliziert.

Bei den je 12 Tieren der Kontrollgruppe erfolgt die Applikation von $5\mu\text{l}$ physiologischer Kochsalzlösung prä- bzw. postischämisch.

2.2.3.3 Applikation von Baclofen

Das Versuchstier wird mitsamt Katheter, Rektalsonde, Heizunterlage und Beatmungsmaske in Bauchlage auf eine Unterlage verbracht, die es erlaubt, den Körper des Tieres in möglichst physiologischer Stellung zu halten, wenn der Schädel des Tieres im Stereotaxierahmen fixiert wird. Dazu werden die beiden von lateral kommenden Ohrpins in den Meatus acusticus externus eingeführt, die das Trommelfell penetrieren

und an der medialen Wand der Paukenhöhle zu liegen kommen. Der Abstand beider Spitzen beträgt bei Tieren, die weniger als 300g wiegen, etwa 11,0mm, bei solchen, die schwerer sind, etwa 12,0mm. Zur endgültigen Fixierung wird die Schneidezahn-Stange entsprechend angelegt.

Mit einem Skalpell wird nun die Kopfhaut bis auf den Knochen medial auf einer Länge von 3cm gespalten. Mit einem Raspatorium wird die Galea aponeurotica vom Periost gelöst und lateralisiert. Die blutenden Venae emissariae und eventuell angeschnittene Arteriolen werden elektrokoaguliert, das Periost mit Wasserstoffperoxid gesäubert.

Nun ist der Bereich um das Bregma gut sichtbar.

Der Schlitten mit der darauf befindlichen Kanüle zur Injektion wird auf seine anteriore Position gerückt und die Kanüle von superior dem Periost genähert. Die Position des Bohrloches auf dem rechten Os parietale wird markiert, die Kanüle wieder entfernt und mit dem Bohrer die Kalotte trepaniert. Die Dura mater wird mit einem „Durahäkchen“, nämlich einer umgebogenen 24G-Nadel, perforiert. Nun kann die Kanüle auf ihre endgültige Position im Seitenventrikel gebracht und die Applikation gestartet werden.

Im Anschluss wird die Kanüle entfernt, die Kalotte mit Knochenwachs abgedichtet und die Wunde desinfiziert. Mit einem Faden der Stärke 6/0 wird die Galea wieder zusammengenäht, mit einem solchen der Stärke 4/0 die Kopfhaut adaptiert.

2.2.4 Messung der Vital- und Laborparameter und Überwachung

Über den Katheter in der A. femoralis ist die direkte Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABP = „mean arterial blood pressure“) möglich. Ein Druckschlauch wird lediglich mit dem

Blutdruckmessmodul verbunden und der MABP fortlaufend vom Registrierteil auf Millimeterpapier gedruckt.

Feste Zahlenwerte werden zu bestimmten, unten aufgeführten Zeitpunkten im Protokoll vermerkt.

In den im Folgenden aufgeführten Abständen wird auch die Rektaltemperatur vermerkt, während der Ischämie wird zusätzlich die Schädeltemperatur notiert.

Ebenso werden zu definierten Zeiten der Blutglukosegehalt bestimmt und eine Blutgasanalyse (BGA) durchgeführt. Das Probevolumen dafür beträgt nur etwa 10µl.

Im präischämischen Versuch wird 1µg Baclofen 30 Minuten vor der Okklusion, im postischämischen Versuch werden 2µg Baclofen 30 Minuten nach der Okklusion appliziert. Die Schemata für den Präischämie- und Postischämieversuch sehen wie auf der folgenden Seite beschrieben aus, auf der sich anschließenden Seite findet sich der im Labor verwendete Datenbogen, der für jeden einzelnen Versuch ausgefüllt wurde.

Präischämische Applikation:

Zeitpunkt	MABP	BGA	Glukose	Rektal-temp.	Schädel-temp.
FA	X	X	X	X	
VAO	X			X	
Prä Bac	X		X	X	
Post Bac	X			X	
CCAO	X	X		X	X
5' post CCAO	X	X		X	X
10' post CCAO		X		X	X
30' post CCAO	X	X	X	X	
60' post CCAO		X		X	

Postischämische Applikation:

	MABP	BGA	Glukose	Rektal-temp.	Schädel-temp.
FA	X	X	X	X	
VAO	X			X	
CCAO	X	X		X	X
5' post CCAO	X	X		X	X
Ende CCAO				X	X
Prä Bac, 30' post CCAO	X	X	X	X	
Post Bac, 35' post CCAO	X			X	
60' post CCAO	X	X	X	X	
90' post CCAO		X		X	

Abkürzungen: **FA** Nach Femoraliskatheter-Anlage; **VAO** Vertebral Artery Occlusion (Verschluss der Aa. vertebrales); **CCAO** Common Carotid Artery Occlusion (Verschluss der Aa. carotides communes); **Bac** Baclofengabe; **MABP** Mean Arterial Blood Pressure (mittlerer arterieller Blutdruck); **BGA** Blutgasanalyse.

Datum:	Tier / Gewicht:	Baclofendosis: 1 µg/5 µl <input type="radio"/> 2 µg/5 µl <input type="radio"/>				
Postischämische Applikation						
	MABP [mmHg]	Glukose [mg/dl]	Rektal-/Schädelttemp. [°C]	pH	pCO ₂	pO ₂
A. femoralis						
Occlusion VA						
Occlusion CCA			/			
5' post occlusionem			/			
10' p. occ.			/			
30' p. occ. et prae Bac.						
35' p. occ. et post Bac.						
60' p. occ.						
90' p. occ.						
Präischämische Applikation						
	MABP [mmHg]	Glukose [mg/dl]	Rektal-/Schädelttemp. [°C]	pH	pCO ₂	pO ₂
A. femoralis						
Occlusion VA						
prae Bac.						
post Bac.						
Occlusion CCA			/			
5' post occlusionem			/			
10' p. occ.			/			
30' p. occ.						
60' p. occ.						
90' p. occ.						

Abb. 33: Datenbogen, so wie er im Labor verwendet worden ist

Das komplette Prozedere wird in einem Versuchsprotokoll festgehalten (siehe Abb. 33).

Dort finden sich auch Anmerkungen zu Reaktionen des Tieres z. B. beim Aufwachen wieder sowie Komplikationen, etwa das frühzeitige Obturieren des arteriellen Zuganges.

Nach der Operation und der Versorgung aller Hautwunden wird die Narkose ausgeleitet.

Daher verbleibt es noch bei etwa 30°C unter einer Rotlichtlampe bis zum allmählichen Aufwachen im Käfig.

2.2.5 In-vivo-Fixierung der Ratte

Nach einem siebentägigen postoperativen Überleben ist mit einer Aggravierung der neuronalen Läsion nicht mehr zu rechnen. Daher findet die Fixierung des Rattenhirns zu diesem Zeitpunkt statt.

Das Tier wird mit Halothan in eine tiefe Narkose versetzt. Nun wird ein Oberbauchquerschnitt durchgeführt. Das Diaphragma wird inzidiert, der knöcherne Thorax entlang der Medioklavikularlinie aufgeschnitten und das Herz dargestellt. Mit einer Schere wird der linke Ventrikel inzidiert und eine stumpfe Kanüle bis in die Aorta ascendens geschoben. Mit einer Bulldog-Klemme wird die mit der Rollerpumpe konnektierte Kanüle im Gefäß fixiert, dann die rechte Auricula cordis inzidiert.

Nun wird der komplette Körper der Ratte mit etwa 100ml physiologischer Kochsalzlösung perfundiert, hiernach erfolgt eine Perfusion mit 500ml einer 4%igen phosphatgepufferten Paraformaldehydlösung.

Die ausgewaschenen Flüssigkeiten werden in einem Glasbassin, worin das Tier erhöht gelagert ist, aufgefangen.

Die Ratte wird mit der Kleintierguillotine dekapitiert.

Das Hirn wird aus dem Neurokranium freipräpariert und hervorluxiert, anschließend für zwei Tage bei 4°C in Paraformaldehydlösung (s. u.) aufbewahrt, um danach bei derselben Temperatur in vergälltem Ethanol (70%) gelagert zu werden.

Zur Herstellung der PBS-gepufferten Paraformaldehydlösung:

KH ₂ PO ₄	0,144g
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	0,526g
NaCl	8g
Paraformaldehyd	40g
Aqua dest.	Ad 1000ml

Die Lösung sollte möglichst frisch angesetzt werden.

2.2.6 Mikroskopie des Gehirns

2.2.6.1 Durchführung der histologischen Aufarbeitung des Gehirns

Das Hirn wird mit der Schneidevorrichtung in einen 6mm messenden Block geschnitten. Die Schnittebenen liegen in der Incisura tentorii und 6mm rostral.

Dieses Präparat wird in einer von der Konzentration her aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 96% und Isopropanol) je zwei Stunden entwässert und im Anschluss daran in Xylol lipophilisiert.

Einen Tag lang inkubiert das Präparat in niedrigschmelzendem Paraffin im Wärmebad bei 60°C, einen weiteren in hochschmelzendem ebenfalls in Wärmeschränk, wird dann in eine Einbettform verbracht und mit hochschmelzendem, 60°C heißen Paraffin ausgegossen.

Die Aushärtung erfolgt bei Raumtemperatur.

2.2.6.2 Histologische Schnitte der Hippokampusregion

Mit dem Mikrotom werden 10 Schnitte der CA1-Region des Hippokampus angefertigt, im Warmwasserbad geglättet und auf einem Objektträger im Wärmeschrank getrocknet.

2.2.6.3 Säurefuchsin-Cölestinblau-Färbung

Das natürliche Präparat hat keinen oder nur einen geringen Bildkontrast. Man kann sich das empirisch unterschiedliche Färbeverhalten von Zell- und Gewebeanteilen zunutze machen, die bestimmte Farbstoffe mit unterschiedlicher Intensität festhalten. Diese absorbieren dann Licht im sichtbaren Spektrum (400-800nm), dessen Komplementärfarbe vom Auge wahrgenommen wird.

Benutzte Färbungen haben also immer eine empirische Komponente: Wenn die entscheidenden Strukturen mit einem bestimmten Farbstoff gut herausgearbeitet worden sind, dieser sich also bewährt hat, wird er wieder verwendet. In unserem Falle ist dies die Färbung mit Säurefuchsin-Cölestinblau.

Die chemische Formel von Säurefuchsin ist in der Abb. 34 beschrieben, die von Cölestinblau in der Abb. 35.

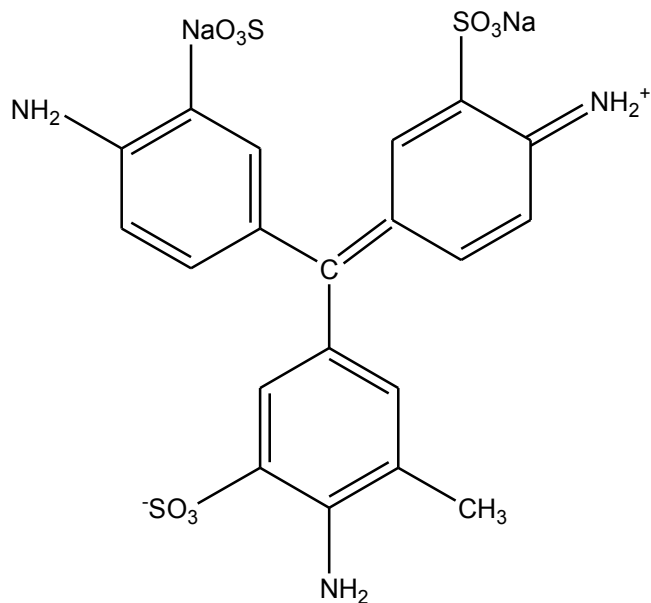


Abb. 34: Säurefuchsin, Summenformel $C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$

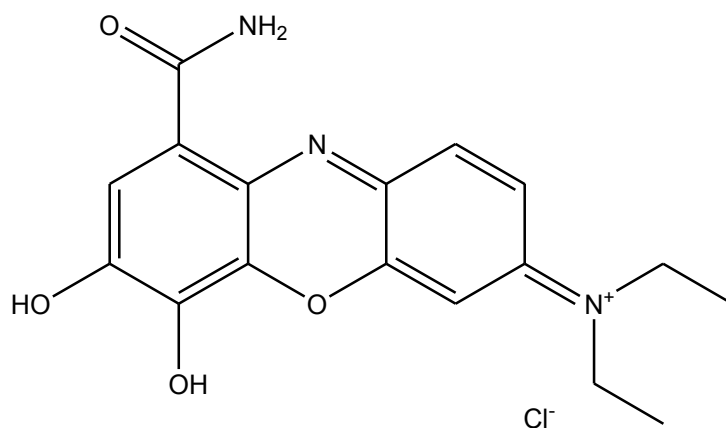


Abb. 35: Cölestinblau, Summenformel $C_{17}H_{18}ClN_3O_4$

Synonyme für diesen Farbstoff sind Fuchsin sauer, Fuchsin S, Rubin S, Säurefuchsin O, Acid Violet 19, Acid magenta, Acid rubin, Acid roseine, Fuchsintrisulfonate.

Tingiert werden basische Kernbestandteile wie Protamine und Histone.

Ergänzend wird mit dem Oxazinfarbstoff Cölestinblau gefärbt, der auch unter den Namen Celestine blue B, Mordant Blue 14 und Corein 2B bekannt ist [86, 87].

Das Färbeprotokoll mit Rezept, wie es sich in unserem Labor etabliert hat, ist im Folgenden wiedergegeben.

Absteigende Alkoholreihe:

5min Rotihistol oder Xylol (3 Durchläufe)

5min Isopropanol

5min EtOH 96%

5min EtOH 80%

5min EtOH 70%

5min Aqua dest (nach jedem Durchgang erneuern)

Farbe:

10min Cölestinblau (vor jedem neuen Färben gut aufrühren)

5min fließendes Leitungswasser

1min Aqua dest

2min Säurefuchsin

2min Essigsäure

Differenzierung:

1min fließendes Leitungswasser

1min Aqua dest

1min EtOH 70%

1min EtOH 96%

1min Isopropanol

Aufsteigende Reihe:

5 min Rotihistol oder Xylol (3 Durchläufe)

Rezepte:

Cölestinblau 1% (für 150ml):

1,5g AmFe (Ammoniumeisensulfat), wasserfrei, und 150ml Aqua dest werden verrührt, der Magnetrührfisch wird entnommen und 0,75ml HCl (37%) werden hinzugegeben und zum Kochen gebracht. Sobald das Gemisch kocht, wird die Wärmequelle ausgeschaltet, sodann 1,5g Cölestinblau zugegeben. Nach dem Abkühlen wird filtriert.

Vor jedem Färbevorgang ist ein gründliches Umrühren erforderlich, die Haltbarkeit beträgt 2 Monate.

Säurefuchsin 1% (für 200ml):

2,0g Säurefuchsin und 200ml Aqua dest werden verrührt. Ein Umrühren vor Gebrauch ist nicht erforderlich.

Essigsäure 1% (für 200ml):

2,0ml Eisessig und 200ml Aqua dest werden verrührt. Die Lösung, die der Fixierung dient, muss vor Gebrauch nicht wieder gerührt werden.

2.2.7 Quantifizierung der Läsion

Sorgfältig wird jener der Hirnschnitte ausgewählt, der die wenigsten Artefakte aufweist und daher am ehesten für die Zählung der geschädigten Zellen und für die Bestimmung ihres Anteils an den Gesamtzellen geeignet erscheint.

Bei diesem Schnitt wird auf einer Seite das CA1- bis CA3-Band überschaut, wie in den Abb. 36 und 38 dargestellt. Sukzessive wird eine möglichst lange Linie von Zählkästchen des Fadenokulars in das CA1-Band gelegt. Ausgewertet werden ausschließlich die Zellen, die sich innerhalb des Mikroskopierfeldes befinden, welches von der Kastenreihe eingeschlossen wird.

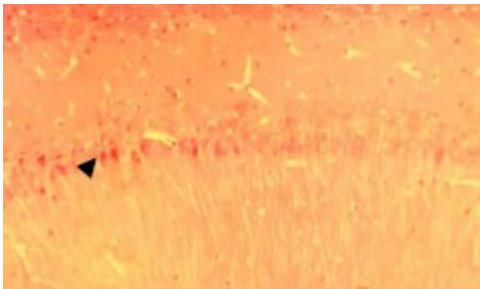


Abb. 36: Beispiel für eine mäßige Pyramidenzell-Schädigung im CA1-Band. Die Pfeilspitze zeigt pyknotische, leuchtend rot angefärbte Neurone

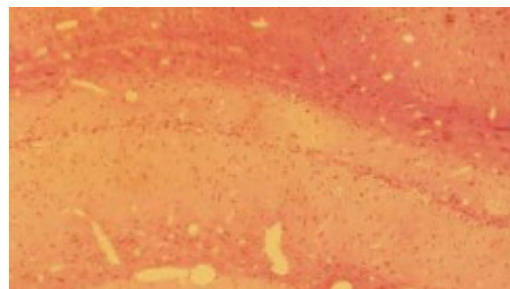


Abb. 37: Deutlicher Zelluntergang im Bereich des Stratum pyramidale des Hippokampus mit Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Alexander Ludolph zur Verfügung gestellt.

Mit einem Zählgerät pro Hand werden links die intakten, also offensichtlich nicht geschädigten Zellen gezählt, während mit der rechten Hand die geschädigten Zellen erfasst werden.

Auf diese Weise ist gewährleistet, dass jede Zelle genau einmal erfasst wird und nicht etwa bei einem zweiten Zählvorgang doppelt gezählt wird – einmal als geschädigte, dann als intakte – oder gar überhaupt nicht erfasst wird, weil man sie beim zweiten Durchgang bereits der anderen Gruppe zugehörig wähnt.

Dieselbe Prozedur muss dann noch beim kontralateralen Hippokampus erfolgen.

Das Ergebnis einer Zählung ist der prozentuale Anteil der Summe der geschädigten Zellen auf beiden Seiten an der Summe der gesamten Zellen.

Die Zählung der verblindeten Schnitte wird zweimal durchgeführt und arithmetisch gemittelt. Die Zählung erfolgte durch einen unabhängigen Dritten.

2.2.8 Statistik

Zur statistischen Auswertung wird der Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben angewendet. Es handelt sich um einen parameterfreien Test, und er ist identisch mit dem Kruskal-Vallis-Test für zwei Gruppen. Er findet Anwendung, wenn nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass die Daten normalverteilt sind. Er ist robust gegen Ausreißer nach oben bzw. unten.

Herausgefunden werden soll, ob in der Kontrollgruppe eine signifikant höhere Zellschädigung vorliegt als in der Verumgruppe. Der Test wird dazu auf den Anteil von geschädigten Zellen in der Verumgruppe und den Anteil von geschädigten Zellen in der Kontrollgruppe angewendet. Insgesamt erfolgen zwei Anwendungen, einmal für den postischämischen Versuchsarm – jeweils mit Verum und Kontrolle – und anschließend für den präischämischen Versuchsarm – ebenfalls mit Verum und Kontrolle.

Als unterstützende Software wird das Statistikprogramm SAS Version 12.0 verwendet.

3 Resultate

3.1 Zellläsionen

Insgesamt 50 Tiere werden in die Versuche eingeschlossen. Die Verteilung sieht wie folgt aus: Die Gruppe, die präischämisch 1µg/5µl Baclofen erhält (n=12), wird gegen die Kontrollgruppe verglichen, welche präischämisch 5µl NaCl erhält (n=11). Die Ergebnisse sind in den Abb. 38 und 39a und b dargestellt, wobei die Charakterisierung der Gruppen zur präziseren Darstellung der Verteilung in Boxplots vorgenommen wurde.

Die Gruppe, welche postischämisch 2µg/5µl Baclofen erhält (n=16), wird gegen die Kontrollgruppe verglichen, welche postischämisch 5µl NaCl erhält (n=11).

Diese Ergebnisse finden sich in den Abb. 40 und 41a und b, in letzterer ebenfalls wieder mit Boxplot-Darstellung.

Auf der x-Achse sind Versuchstiere aufgetragen: Die Nummern der Versuchstiere entsprechen nicht jenen in den Laboraufzeichnungen, vielmehr sind sie zur besseren Übersicht nach zunehmender Zellschädigung sortiert.

Die linke Säule im Diagramm stellt das Tier aus der Verum-Gruppe dar (blau), die rechte Säule bezeichnet das Tier aus der Kontrollgruppe (rot).

Auf der y-Achse findet sich der prozentuale Anteil an geschädigten Neuronen im CA1- bis CA3-Band.

Anteil geschädigter hippocampaler Pyramidenzellen
(aufsteigend sortiert) im Präischämieversuch ($p=0,021$)

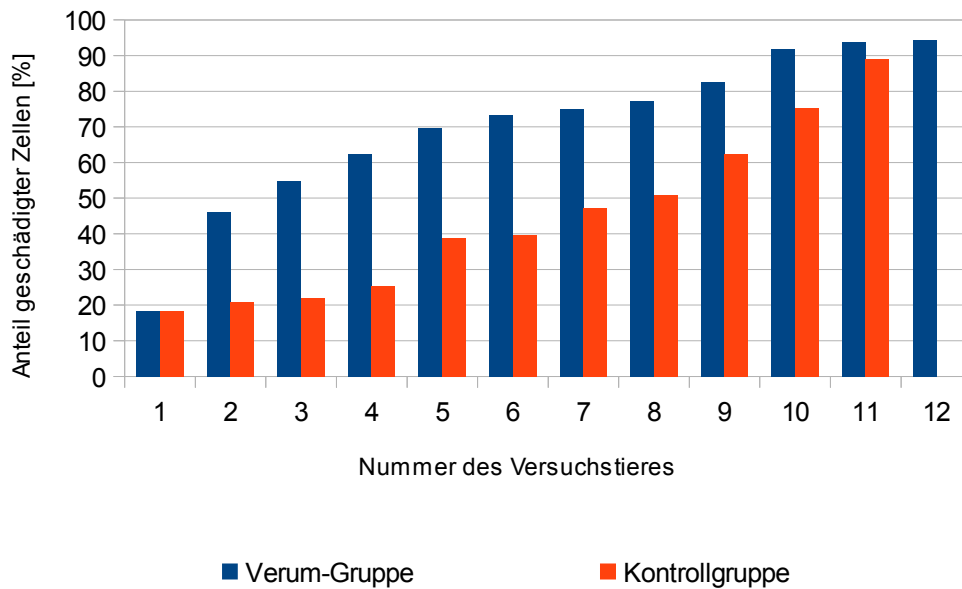


Abb. 38: Präischämische Applikation von $1\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ Baclofen in der Verum-Gruppe (12 Tiere) versus $5\mu\text{l}$ NaCl in der Kontrollgruppe (11 Tiere)

Die Zahl der geschädigten Zellen ist in der Verum-Gruppe signifikant größer ($p=0,021$) als in der Plazebo-Gruppe.

Eine Darstellung mit Boxplots findet sich in den nachfolgenden Abb. 39a und 40b.

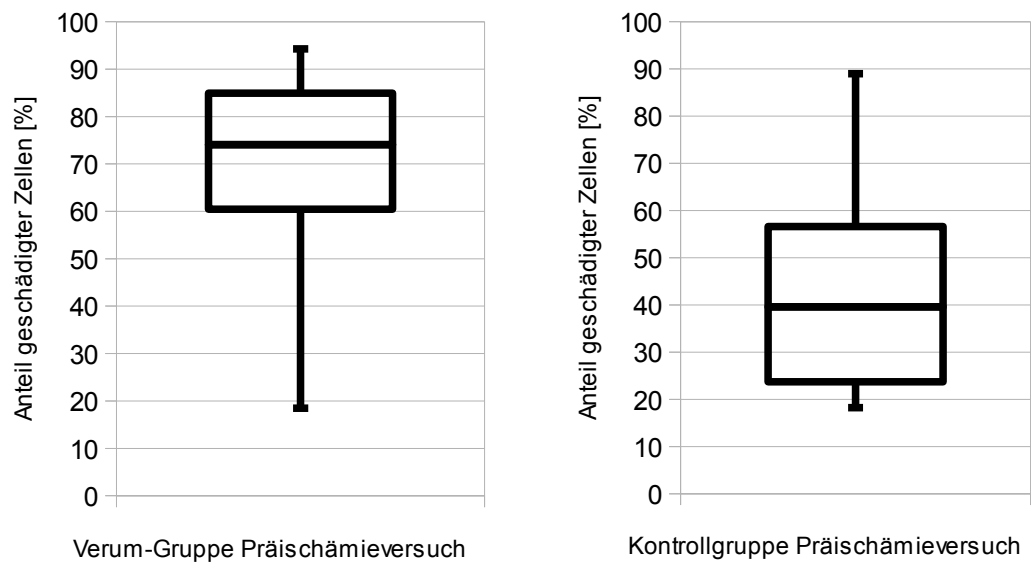


Abb. 39a und b: Präischämische Applikation: Darstellung der hippokampalen Zellschädigung mit Boxplots. Die Schädigungsbreite beträgt 77,85% vs. 70,8%, der Median 74,05% vs. 39,6% (Mittelwerte: 77,9% vs. 44,5%, nicht eingezeichnet). Die 75. Perzentile liegt bei 84,94% vs. 56,61%, die 25. Perzentile bei 60,43% vs. 23,7%. Die maximale Schädigung erreicht 94,3% vs. 89,0%, minimal geschädigt sind 18,45% vs. 18,2%.

Die Standardabweichung beträgt 22,13% vs. 23,41%.

Die Schädigung in der Verum-Gruppe ist signifikant erhöht ($p=0,021$).

Ganz anders sehen die Resultate im Postischämieversuch aus. Dort scheint die applizierte Menge von Baclofen keinen signifikanten Effekt ($p=0,093$) auf den Anteil der geschädigten Zellen zu haben:

Anteil geschädigter hippocampaler Pyramidenzellen
(aufsteigend sortiert) im Postischämieversuch ($p=0,093$)

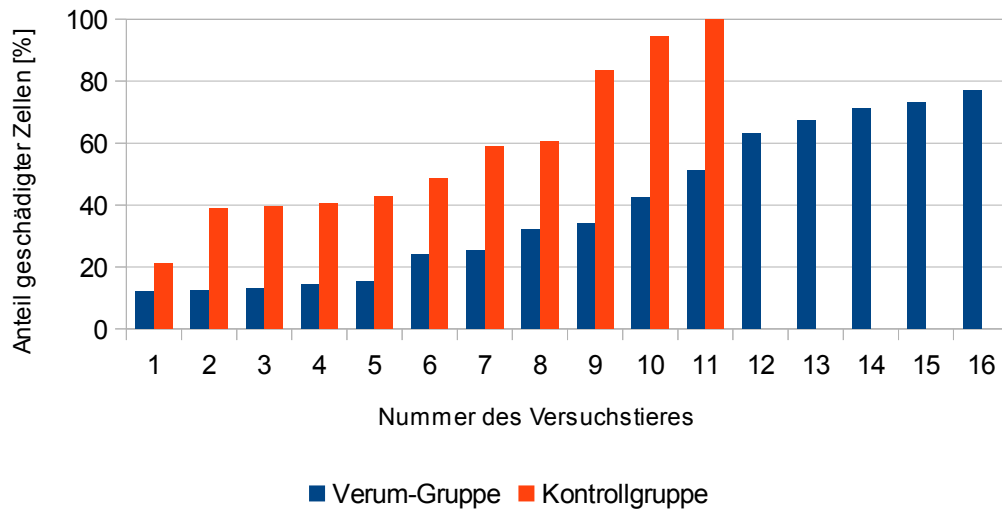
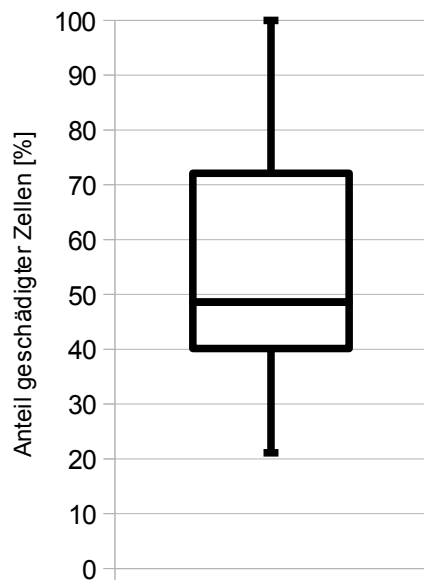
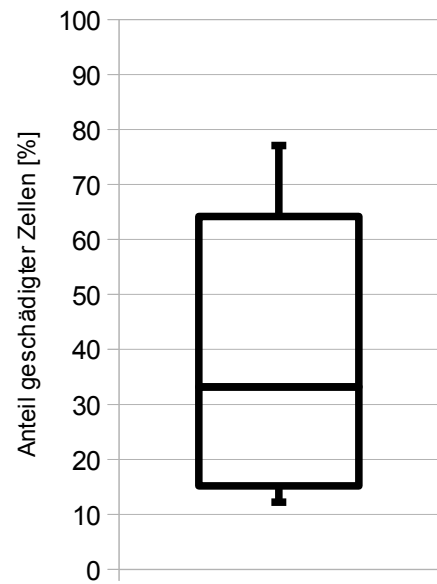


Abb. 40: Postischämische Applikation von 2µg/5µl Baclofen in der Verum-Gruppe (16 Tiere) versus 5µl NaCl in der Kontrollgruppe (11 Tiere)

Eine Darstellung mit Boxplots findet sich in den nachfolgenden Abb. 41a und b.



Postischämieversuch Kontrollgruppe



Postischämieversuch Verum-Gruppe

Abb. 41a und b: Postischämische Applikation: Darstellung der hippokampalen Zellschädigung mit Boxplots. Die Schädigungsbreite beträgt 64,85% vs. 78,9%, der Median 26,6% vs. 48,6% (Mittelwerte: 39,3% vs. 57,2%, nicht eingezeichnet). Die 75. Perzentile liegt bei 64,16% vs. 72,09%, die 25. Perzentile bei 15,18% vs. 40,14%. Die maximale Schädigung erreicht 77,1% vs. 100%, minimal geschädigt sind 12,25% vs. 21,1%.

Die Standardabweichung beträgt 24,40% vs. 25,36%

Die Schädigungsdiskrepanz erreicht kein Signifikanzniveau ($p=0,093$).

Im Folgenden die detaillierten Ergebnisse der hippokampalen Zellschädigung [%] gemäß der im Methodenteil erwähnten Auswertung. Die Versuchstiernummer entspricht hier derjenigen in den Experimenten und ist daher innerhalb einzelnen Versuchsserien chronologisch:

Versuchstier N=	Präischämisch (Verum-Gruppe)	Präischämisch (Kontrollgruppe)	Postischämisch (Verum-Gruppe)	Postischämisch (Kontrollgruppe)
1	93,75	21,9	15,4	59,00
2	82,65	39,6	14,5	94,47
3	69,7	62,3	63,1	48,60
4	18,45	47,2	73,25	60,57
5	46,2	38,8	12,5	100,00
6	91,8	75,4	42,5	42,90
7	74,9	18,2	67,35	40,68
8	94,3	20,86	77,1	39,60
9	54,8	25,5	34,2	38,90
10	77,15	89	25,2	21,10
11	73,2	50,92	12,95	83,60
12	62,3		12,25	
13			51,2	
14			71,05	
15			24,1	
16			32,15	

3.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (Mean arterial blood pressure, MABP)

Der Ausgangs-MABP bei Kanülierung der A. femoralis bewegt sich im Bereich von 59 bis 124mmHg (97,14mmHg), der MABP nach Okklusion der Aa. vertebrales im Bereich von 68 bis 127mmHg (95,62mmHg) bei allen Tieren. Hier gibt es keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen.

In der Präischämiegruppe haben die Verum-Tiere einen signifikant niedrigeren MABP als die Plazebo-Tiere direkt nach Injektion; die Differenz beträgt im Mittel 11,92mmHg.

In der Postischämiegruppe haben die Verum-Tiere ebenfalls einen signifikant niedrigeren MABP als in der Plazebo-Gruppe nach Injektion; hier beträgt die Differenz 17,50mmHg.

Dieser Unterschied bleibt zu weiteren Messzeitpunkten bis zum Versuchsende bestehen.

Die Darstellung der Mittelwerte wurde in den nachfolgenden Diagrammen vorgenommen (Abb. 42 und Abb. 43).

Zu den einzelnen Messzeitpunkten $T = 1$ bis 7 wurden die korrespondierenden Boxplots dargestellt (Abb. 42a-g und 43a-g).

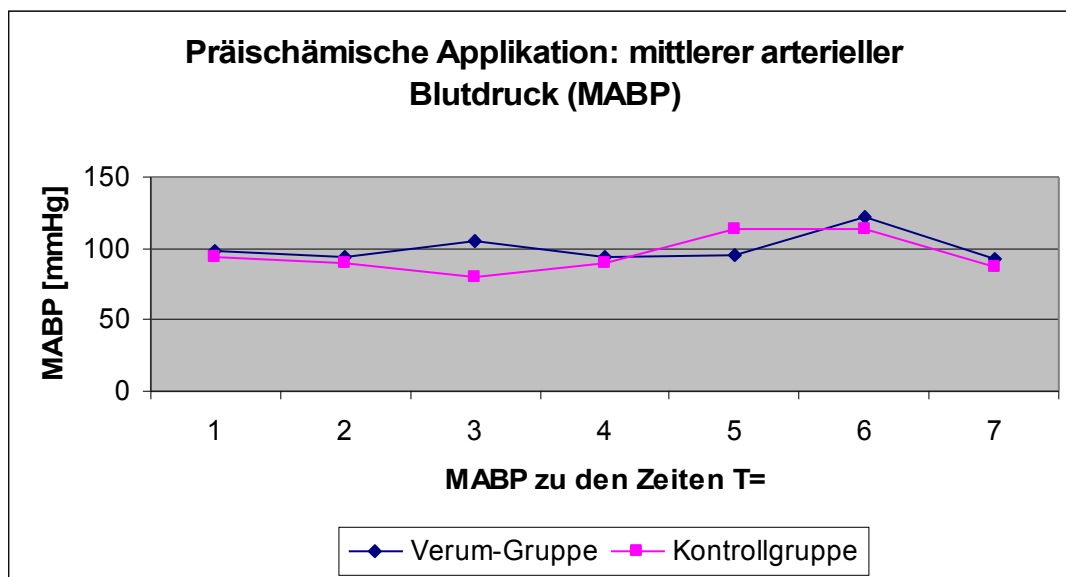
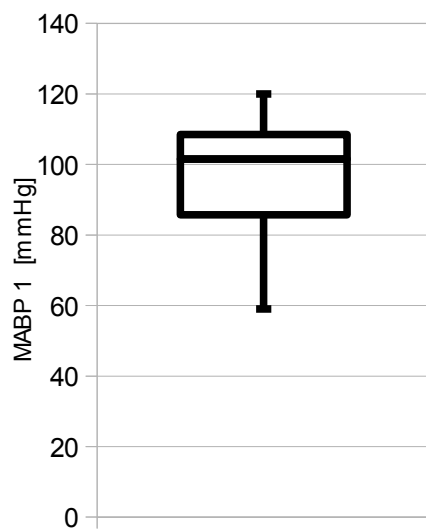


Abb. 42: Mittelwerte der MABP im präischämischen Versuchsarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten T = 1 (Einbringen des Katheters in die A. femoralis), T = 2 (Verschluss der Aa. vertebrales), T = 3 (direkt vor Baclofenapplikation), T = 4 (direkt nach Baclofenapplikation), T = 5 (bei Verschluss der Aa. carotides communes), T = 6 (5min nach Verschluss der Aa. carotides communes) und T = 7 (am Versuchsende).

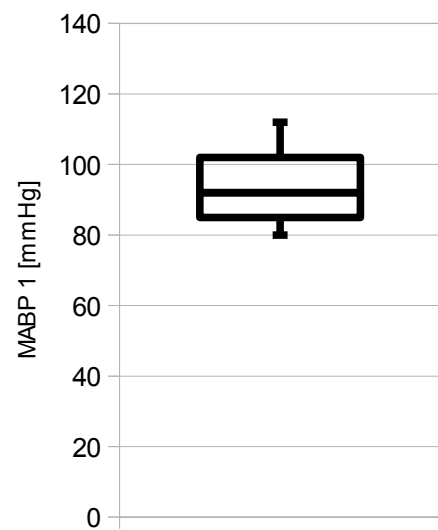
Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	4	5	6	7	Messzeitpunkt
97,75	93,75	105,67	93,75	94,75	121,42	92,33	Verum-Gruppe
94,18	89,60	80,20	90,00	113,60	113,80	86,80	Kontrollgruppe

Zu den einzelnen Messzeitpunkten (T = 1 bis 7) sind die jeweiligen Versuchsgruppen als Boxplot einander gegenübergestellt (Abb. 42a-g). Um der Übersichtlichkeit willen wurden die Einheiten, die sich aus den Abbildungen ergeben, weggelassen.



Präischämieversuch Verumgruppe



Präischämieversuch Kontrollgruppe

Abb. 42a

Standardabweichung: 17,64 vs. 11,04

Minimum: 59 vs. 80

Unteres Quartil: 85,75 vs. 85

Median: 101,5 vs. 92

Oberes Quartil: 108,5 vs. 102

Maximum: 120 vs. 112

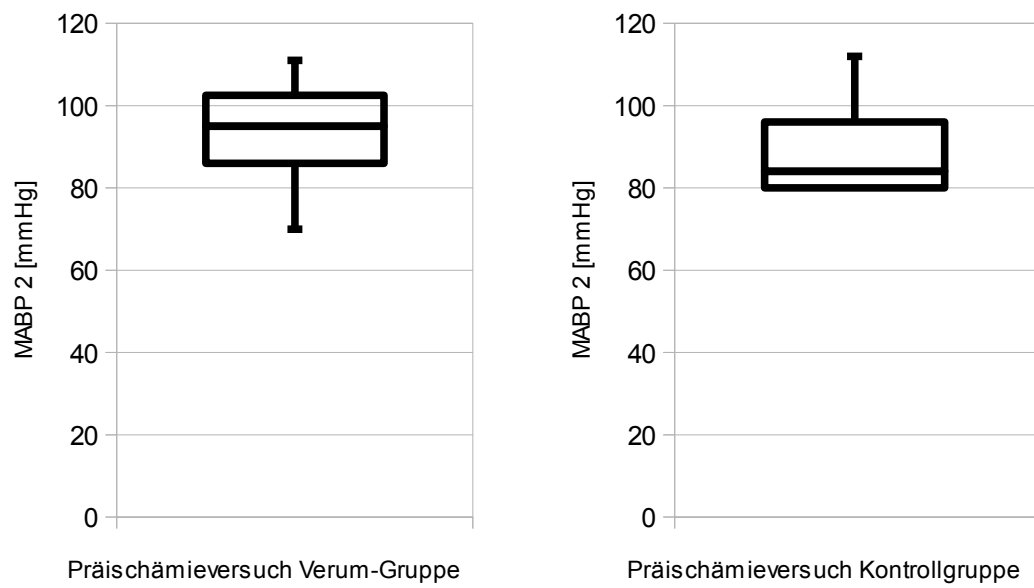


Abb. 42b

Standardabweichung: 13,55 vs. 11,65

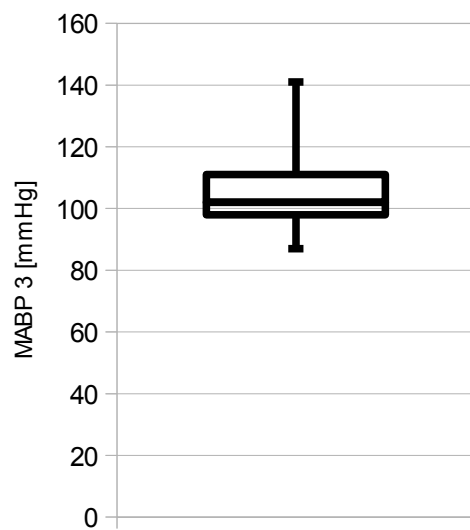
Minimum: 70 vs. 80

Unteres Quartil: 86 vs. 80

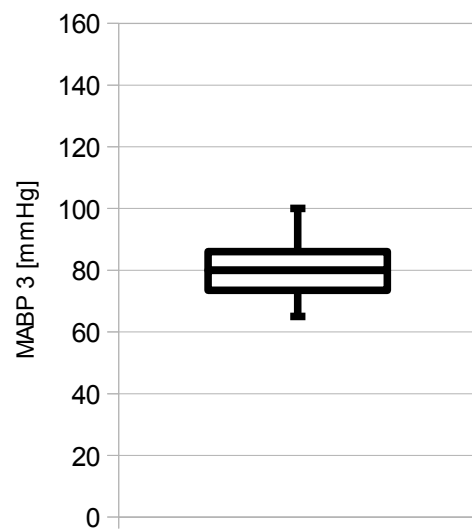
Median: 95 vs. 84

Oberes Quartil: 102,5 vs. 96

Maximum: 111 vs. 112



Präischämieversuch Verum-Gruppe



Präischämieversuch Kontroll-Gruppe

Abb. 42c

Standardabweichung: 15,68 vs. 11,75

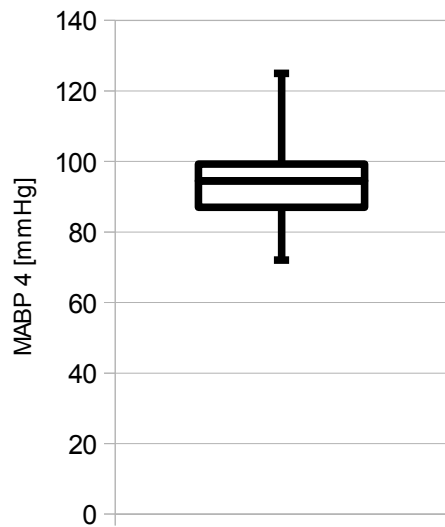
Minimum: 87 vs. 65

Unteres Quartil: 98 vs. 73,5

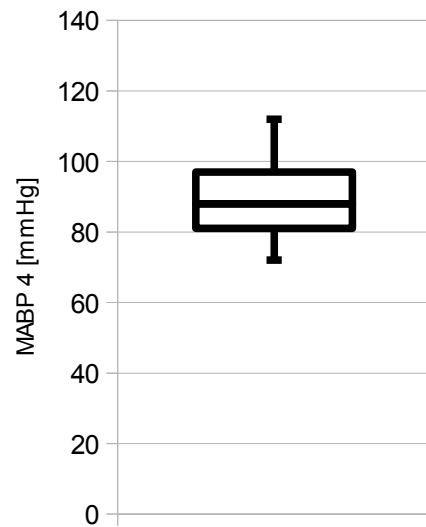
Median: 102 vs. 80

Oberes Quartil: 111 vs. 86

Maximum: 141 vs. 100



Präischämieversuch Verum-Gruppe



Präischämieversuch Kontrollgruppe

Abb. 42d

Standardabweichung: 14,50 vs. 12,82

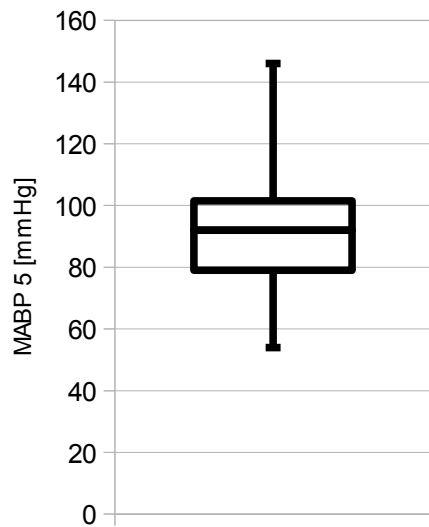
Minimum: 72 vs. 72

Unteres Quartil: 87 vs. 81

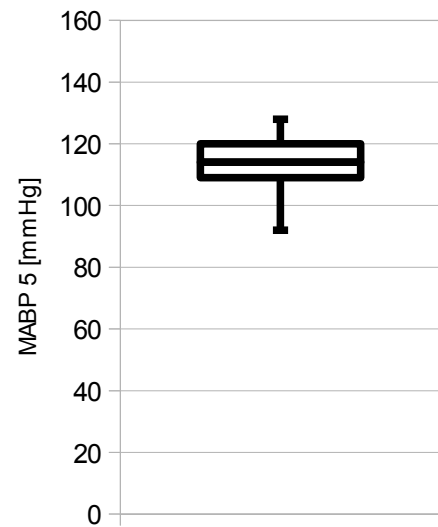
Median: 94,5 vs. 88

Oberes Quartil: 99,25 vs. 97

Maximum: 125 vs. 112



Präischämieversuch Verum-Gruppe



Präischämieversuch Kontrollgruppe

Abb. 42e

Standardabweichung: 29,31 vs. 10,53

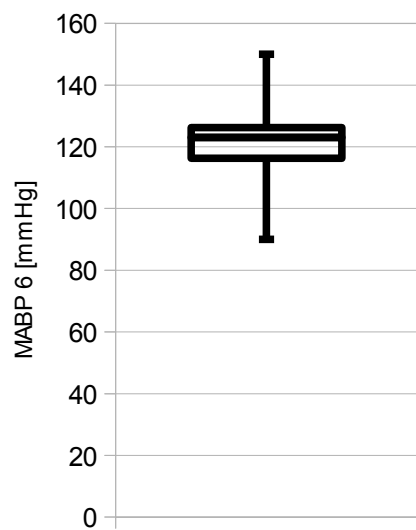
Minimum: 54 vs. 92

Unteres Quartil: 79 vs. 109

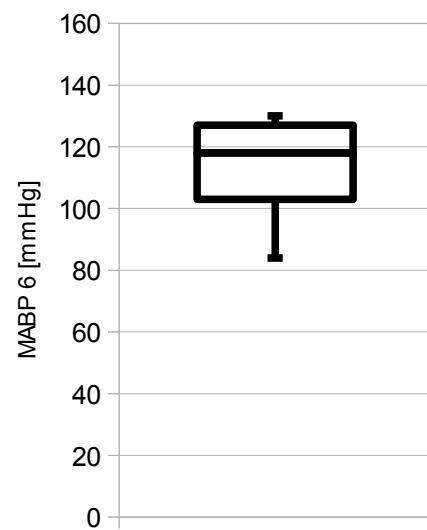
Median: 92 vs. 114

Oberes Quartil: 101,5 vs. 120

Maximum: 146 vs. 128



Präschämieversuch Verum-Gruppe



Präschämieversuch Kontrollgruppe

Abb. 42f

Standardabweichung: 14,66 vs. 15,68

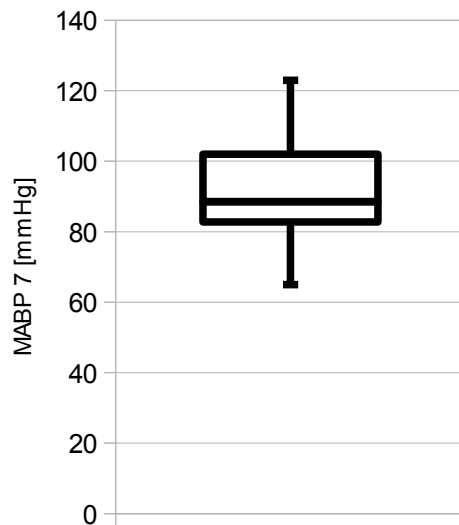
Minimum: 90 vs. 84

Unteres Quartil: 116,25 vs. 103

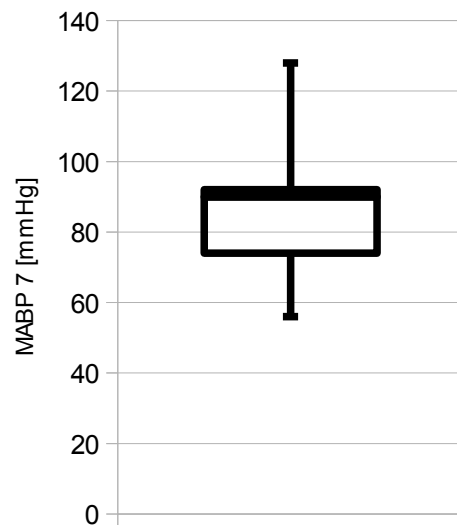
Median: 123 vs. 118

Oberes Quartil: 126,25 vs. 127

Maximum: 150 vs. 130



Präischämieversuch Verum-Gruppe



Präischämieversuch Kontrollgruppe

Abb. 42g

Standardabweichung: 16,09 vs. 19,78

Minimum: 65 vs. 56

Unteres Quartil: 82,75 vs. 74

Median: 88,5 vs. 90

Oberes Quartil: 102 vs. 92

Maximum: 123 vs. 128

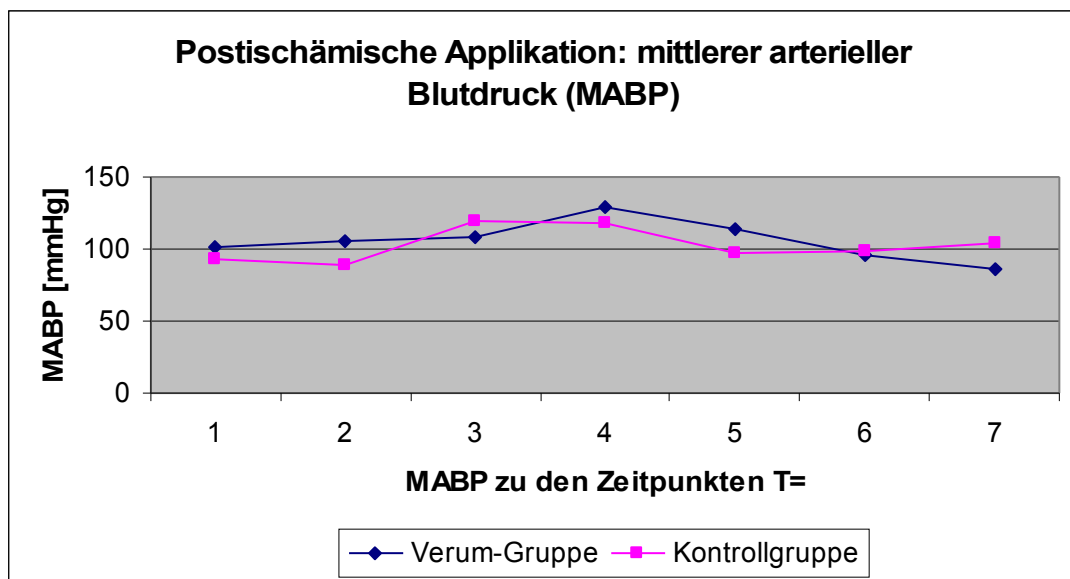


Abb. 43: Mittelwerte der MABP im postischämischen Versuchssarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Einbringen des Katheters in die A. femoralis), 2 (Verschluss der Aa. vertebrales), 3 (bei Verschluss der Aa. carotides communes), 4 (5min nach Verschluss der Aa. carotides communes), 5 (direkt vor Baclofenapplikation und 30min nach 4VO), 6 (direkt nach Baclofenapplikation und 35min nach 4VO) und 7 (am Versuchsende).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	4	5	6	7	Messzeitpunkt
101,75	105,31	108,50	128,88	113,81	96,31	86,62	Verum-Gruppe
93,08	89,58	119,18	117,55	96,90	98,50	103,56	Kontrollgruppe

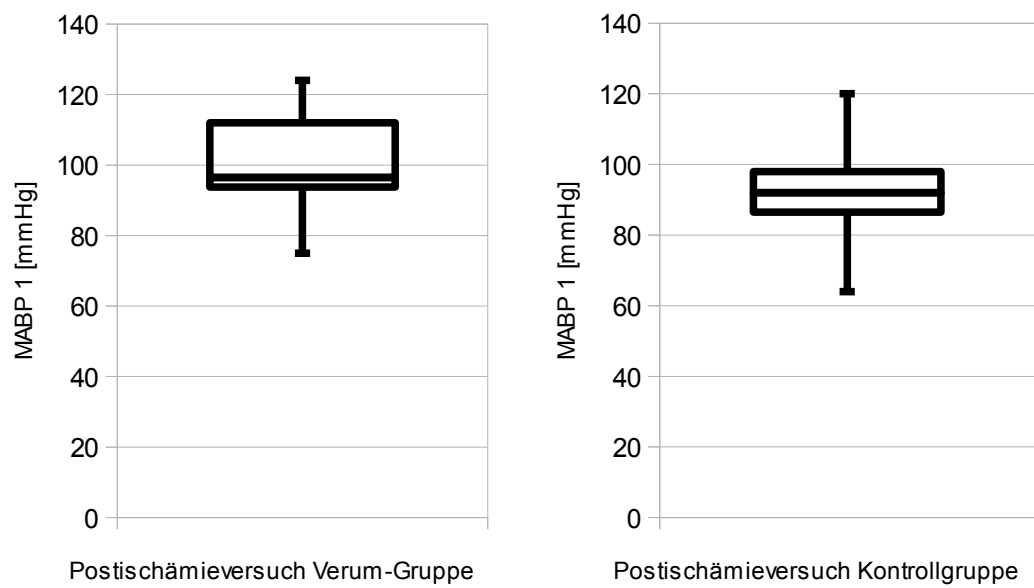


Abb. 43a

Standardabweichung: 13,19 vs. 13,81

Minimum: 75 vs. 64

Unteres Quartil: 93,75 vs. 86,5

Median: 96,5 vs. 92

Oberes Quartil: 112 vs. 98

Maximum: 124 vs. 120

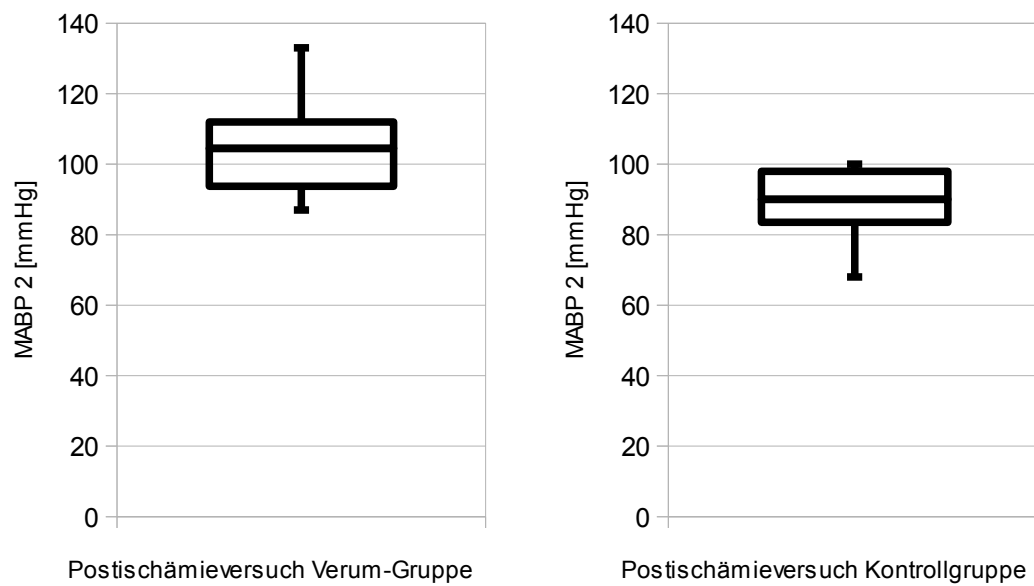


Abb. 43b

Standardabweichung: 13,48 vs. 10,16

Minimum: 87 vs. 68

Unteres Quartil: 93,75 vs. 83,5

Median: 104,5 vs. 90

Oberes Quartil: 112 vs. 98

Maximum: 133 vs. 100

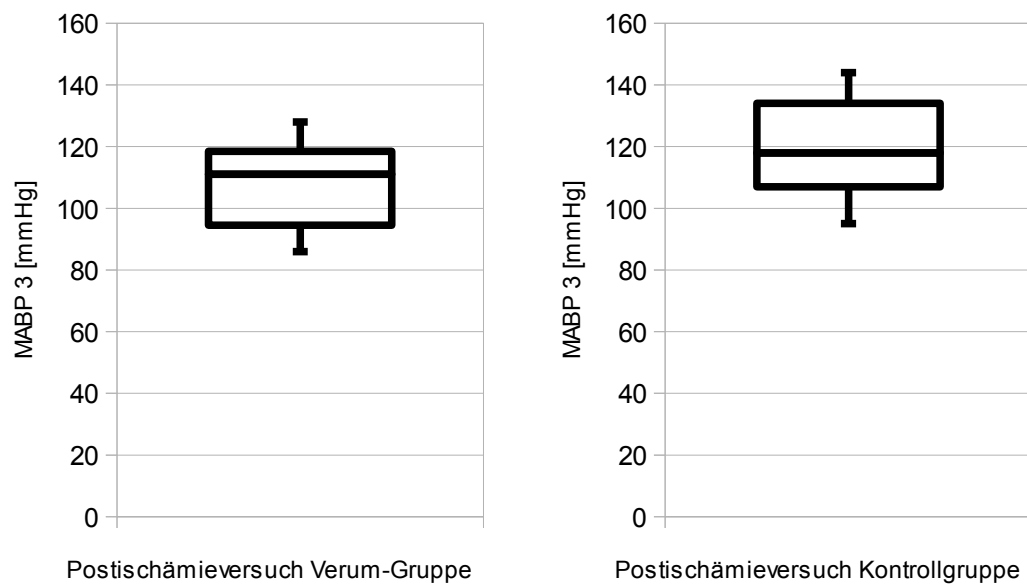


Abb. 43c

Standardabweichung: 13,51 vs. 15,42

Minimum: 86 vs. 95

Unteres Quartil: 94,5 vs. 107

Median: 111 vs. 118

Oberes Quartil: 118,5 vs. 134

Maximum: 128 vs. 144

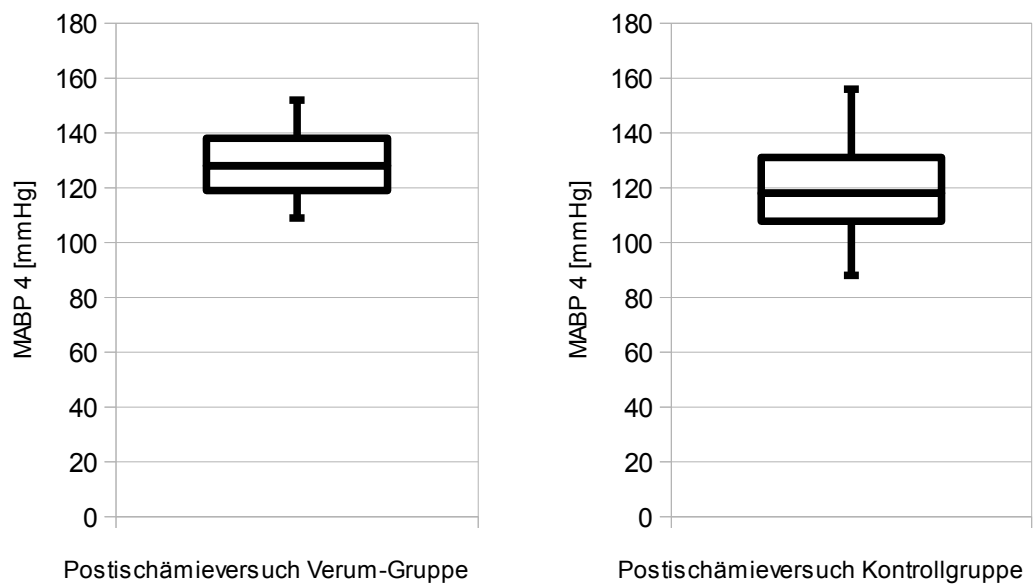


Abb. 43d

Standardabweichung: 12,86 vs. 20,67

Minimum: 109 vs. 88

Unteres Quartil: 119 vs. 107,75

Median: 128 vs. 118

Oberes Quartil: 138 vs. 131

Maximum: 152 vs. 156

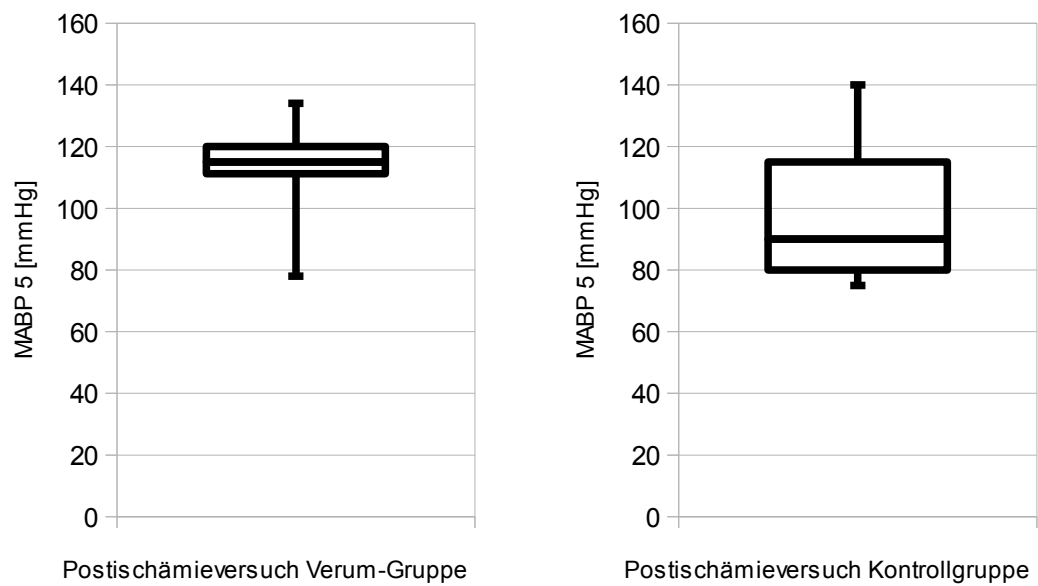


Abb. 43e

Standardabweichung: 12,48 vs. 22,50

Minimum: 78 vs. 75

Unteres Quartil: 111,25 vs. 80

Median: 115 vs. 90

Oberes Quartil: 120 vs. 115

Maximum: 134 vs. 140

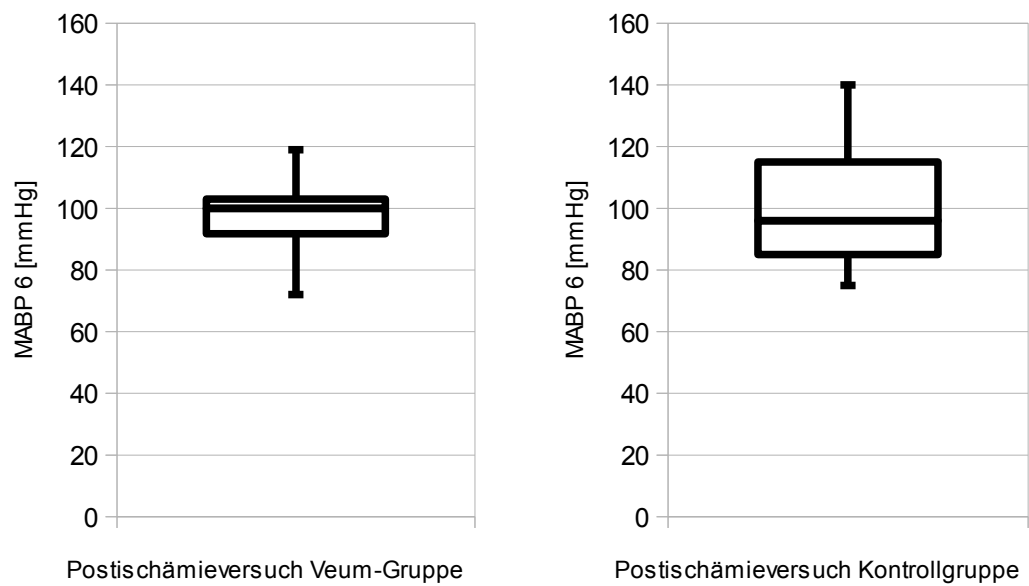


Abb. 43f

Standardabweichung: 12,38 vs. 22,10

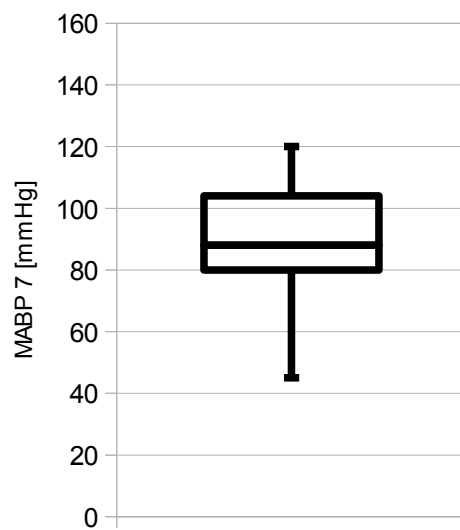
Minimum: 72 vs. 75

Unteres Quartil: 91,75 vs. 85

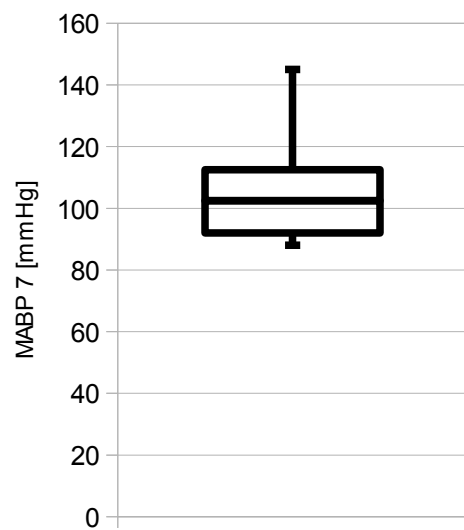
Median: 100 vs. 96

Oberes Quartil: 103 vs. 115

Maximum: 119 vs. 140



Postischämieversuch Verum-Gruppe



Postischämieversuch Kontrollgruppe

Abb. 43g

Standardabweichung: 24,54 vs. 19,71

Minimum: 45 vs. 88

Unteres Quartil: 80 vs. 92

Median: 88 vs. 102,5

Oberes Quartil: 104 vs. 112,5

Maximum: 120 vs. 145

3.3 Rektaltemperatur

Die Rektaltemperatur kann sowohl in der Prä- als auch in der Postischämiegruppe bei jedem einzelnen Tier zu den drei Zeitpunkten Versuchsbeginn, inтраischämisch und bei Versuchsende zwischen 36,5°C und 37,5°C konstant gehalten werden. Einzige Ausnahme ist ein Tier aus der präischämischen Kontrollgruppe: Inтраischämisch beträgt hier die Temperatur 36,4°C. Im Mittel liegen die Temperaturen zwischen 36,7°C und 37,2°C.

Die Darstellung der Mittelwerte zu allen Zeitpunkten wurde in den nachfolgenden Diagrammen vorgenommen (Abb. 44 und Abb. 45).

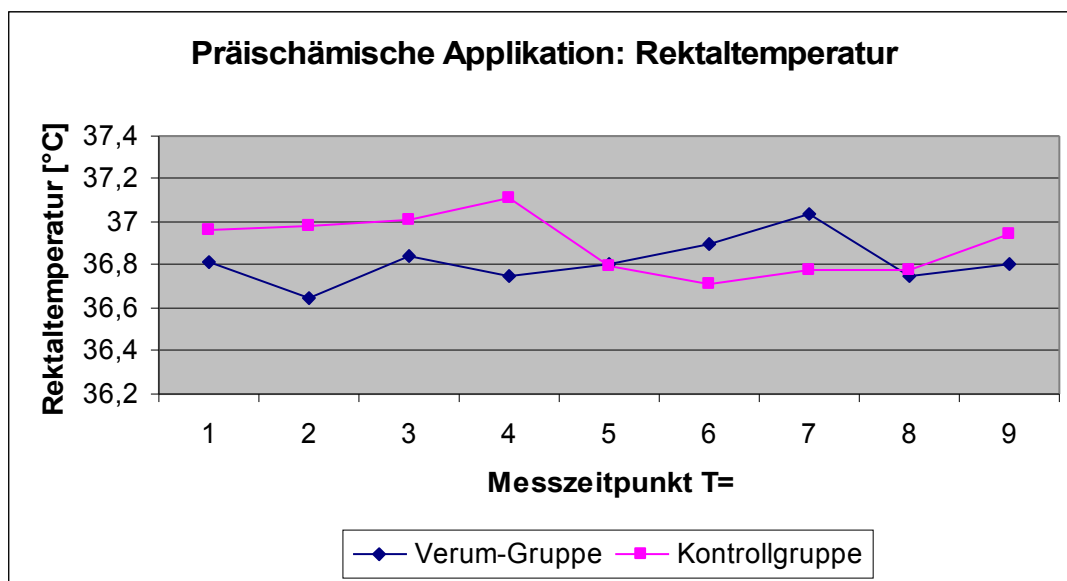


Abb. 44: Mittelwerte der rektalen Temperaturen (Körperkerntemperatur) im präischämischen Versuchsarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Einbringen des Katheters in die A. femoralis), 2 (Verschluss der Aa. vertebrales), 3 (direkt vor Baclofenapplikation), 4 (direkt nach Baclofenapplikation), 5 (bei Verschluss der Aa. carotides communes), 6 (5min nach Verschluss der Aa. carotides communes), 7 (10min nach Verschluss der Aa. carotides communes, also direkt postischämisch), 8 (30min post 4VO) und 9 (60min post 4VO, Versuchsende).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	Messzeitpunkt
36,82	36,65	36,84	36,75	36,81	36,90	37,03	36,75	36,80	Verum-Gruppe
36,96	36,98	37,01	37,11	36,80	36,71	36,77	36,77	36,95	Kontrollgruppe

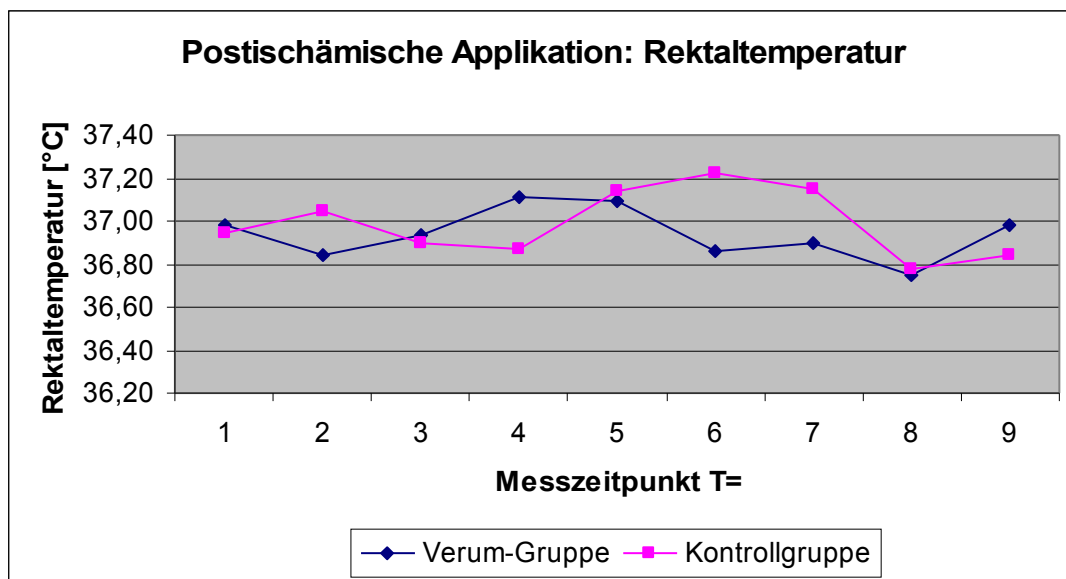


Abb. 45: Mittelwerte der rektalen Temperaturen (Körperkerntemperatur) im postischämischen Versuchsarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Einbringen des Katheters in die A. femoralis), 2 (Verschluss der Aa. vertebrales), 3 (bei Verschluss der Aa. carotides communes), 4 (5min nach Verschluss der Aa. carotides communes), 5 (10min nach Verschluss der Aa. carotides communes, also direkt postischämisch), 6 (direkt vor Baclofenapplikation, also 30min post 4VO), 7 (direkt nach Baclofenapplikation, also 35min post 4VO), 8 (60min post 4VO) und 9 (90min post 4VO, Versuchsende).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	Messzeitpunkt
36,98	36,84	36,94	37,11	37,09	36,86	36,90	36,75	36,98	Verum-Gruppe
36,94	37,05	36,90	36,87	37,14	37,23	37,15	36,77	36,84	Kontrollgruppe

3.4 Intrakranielle Temperatur

Wie bereits im Methodenteil erwähnt, wurde die intrakranielle Temperatur näherungsweise über eine Temperatursonde im M. temporalis bestimmt.

In der postischämischen Kontroll- und der präischämischen Verumgruppe liegt die Temperatur bei allen Tieren im Bereich von 36,8 bis 37,2°C. Ausnahmen hiervon gibt es bei drei Tieren der präischämischen Kontrollgruppe (37,3°C, 37,3°C und 37,5°C) und bei drei Tieren der postischämischen Verumgruppe (37,3°C, 37,5°C und 37,5°C).

Die Darstellung der Mittelwerte wurde in den nachfolgenden Diagrammen vorgenommen (Abb. 46 und Abb. 47).

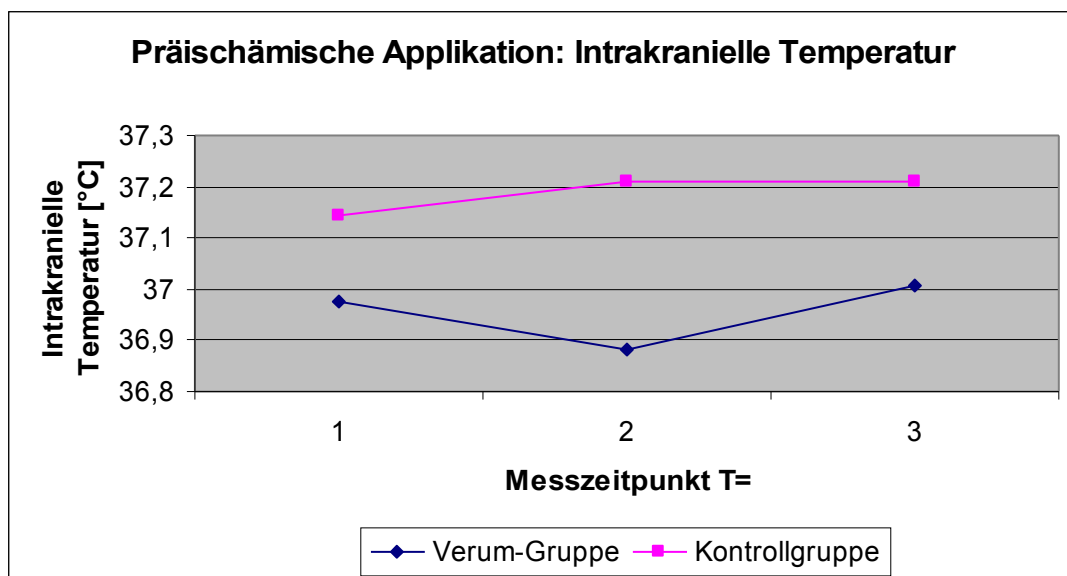


Abb. 46: Darstellung des intrainischämischen Verlaufs der intrakraniellen Temperatur im präischämischen Versuchsarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Beginn der Ischämie), 2 (5' post 4VO) und 3 (Ende der Ischämie, 10' post 4VO).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	Messzeitpunkt
36,98	36,88	37,01	Verum-Gruppe
37,15	37,21	37,21	Kontrollgruppe

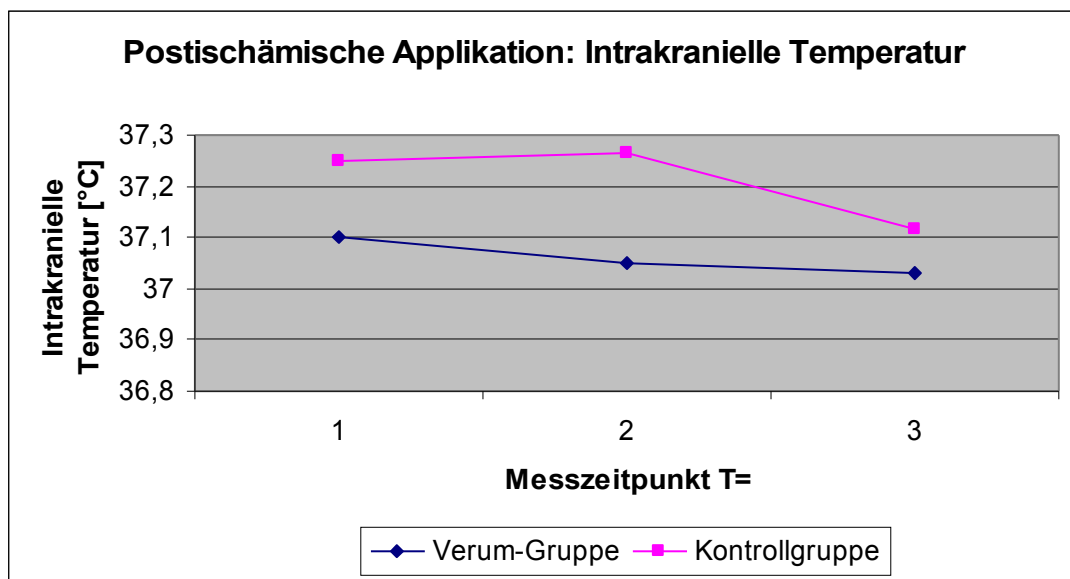


Abb. 47: Darstellung des intraintraskämischen Verlaufs der intrakraniellen Temperatur im postischämischen Versuchssarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Beginn der Ischämie), 2 (5' post 4VO) und 3 (Ende der Ischämie, 10' post 4VO).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	Messzeitpunkt
37,10	37,05	37,03	Verum-Gruppe
37,25	37,27	37,12	Kontrollgruppe

3.5 Blutglukosespiegel aus der Femoralarterie

Präischämiegruppe. Hier sind die Blutglukosewerte zum Messzeitpunkt 1 bei Kanülierung der A. femoralis nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,389$). Die Werte bei den Kontroll- und Verumtieren ($n=23$) liegen zwischen 75mg/dl und 149mg/dl (106,09mg/dl).

Ein signifikanter Unterschied stellt sich zum Messzeitpunkt 2 ($n=22$) vor Baclofengabe dar ($p=0,041$), wo die Werte zwischen 39 und 149mg/dl streuen (97,82mg/dl) und am Ende des Versuchs ($n=19$) zum Messzeitpunkt 3 ($p=0,045$). Hier liegen die Werte zwischen 47 und 152mg/dl (99,11mg/dl).

Postischämiegruppe. Hier ergeben sich zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede. Zu Versuchsbeginn (Messzeitpunkt 1, $n=28$, $p=0,352$) liegen die Werte zwischen 56 und 142mg/dl (92,79mg/dl).

Zum Messzeitpunkt 2 ($n=24$, $p=0,121$) liegen die Werte im Bereich von 47 bis 139mg/dl (85,17mg/dl).

Zum Messzeitpunkt 3 ($n=17$, $p=0,596$) streuen die Werte von 70 bis 119mg/dl (87,29mg/dl).

Die Darstellung der Mittelwerte gemäß dem o. g. Schema (Abb. 33) wurde in den nachfolgenden Diagrammen vorgenommen (Abb. 48 und Abb. 49).

Zu den einzelnen Messzeitpunkten $T = 1$ bis 3 wurden die korrespondierenden Boxplots dargestellt (Abb. 48a-c und Abb. 49a-c).

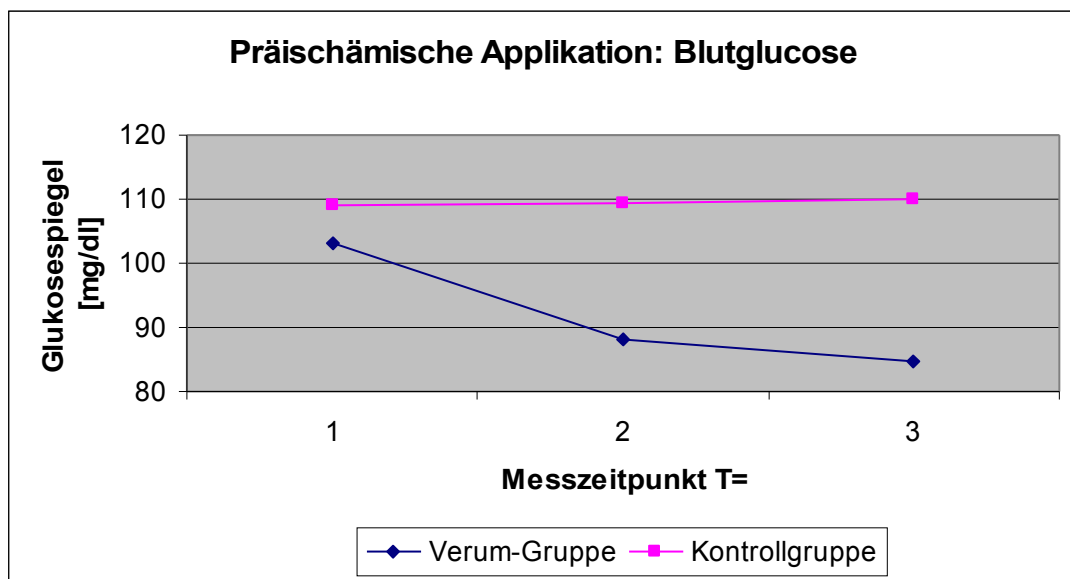


Abb. 48: Darstellung Verlaufs des Blutglukosespiegels über den ganzen Versuch im präischämischen Arm hinweg zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Kanülierung der Femoralarterie), 2 (prä Bac) und 3 (Versuchsende).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	Messzeitpunkt
103,25	88,17	84,67	Verum-Gruppe
109,18	109,40	109,90	Kontrollgruppe

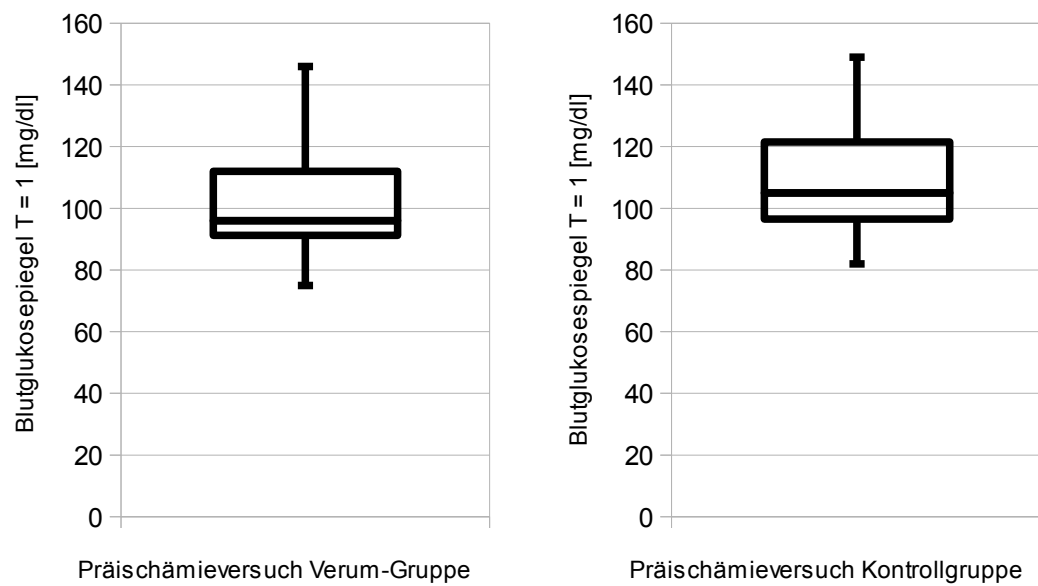


Abb. 48a

Standardabweichung: 22,69 vs. 19,65

Minimum: 75 vs. 82

Unteres Quartil: 91,25 vs. 96,5

Median: 96 vs. 105

Oberes Quartil: 112 vs. 121,5

Maximum: 146 vs. 149

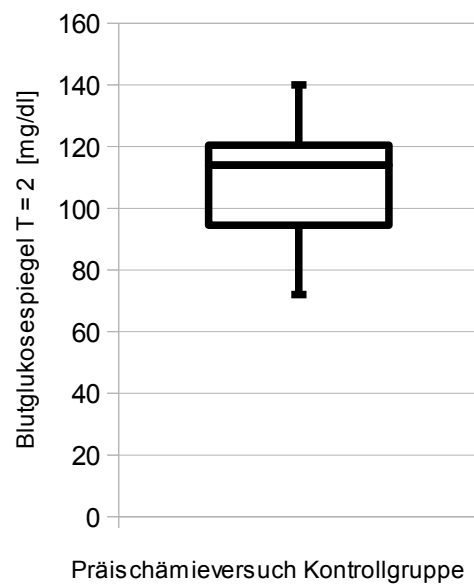
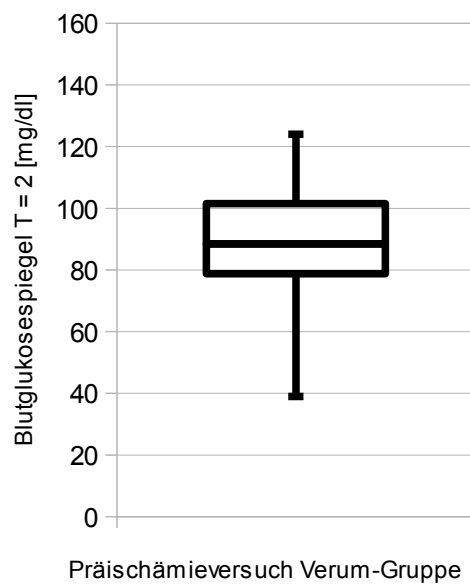


Abb. 48b

Standardabweichung: 23,69 vs. 20,45

Minimum: 39 vs. 72

Unteres Quartil: 78,75 vs. 94,5

Median: 88,5 vs. 114

Oberes Quartil: 101,5 vs. 120,5

Maximum: 124 vs. 140

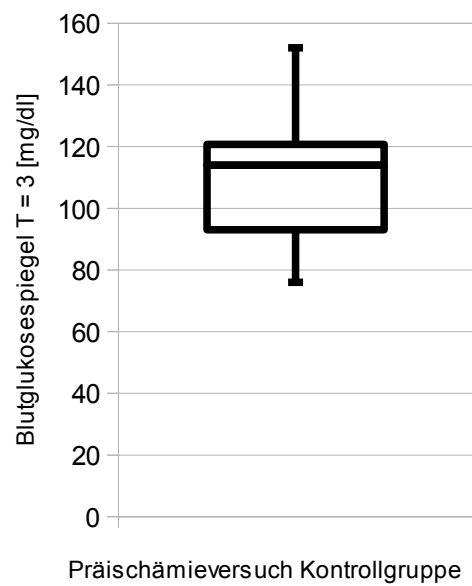
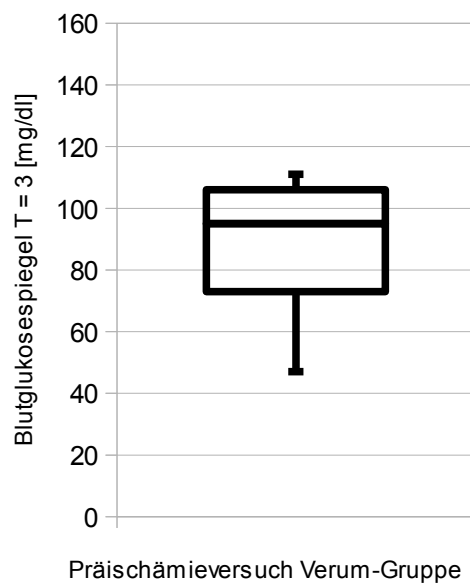


Abb. 48c

Standardabweichung: 22,78 vs. 22,43

Minimum: 47 vs. 76

Unteres Quartil: 73 vs. 93

Median: 95 vs. 114

Oberes Quartil: 106 vs. 120,75

Maximum: 111 vs. 152

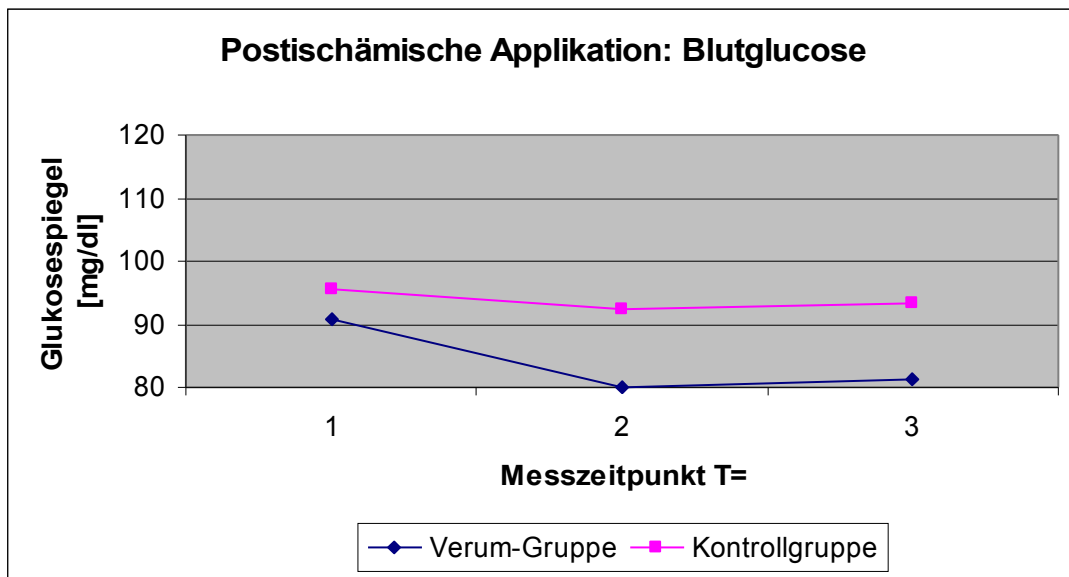


Abb. 49: Darstellung Verlaufs des Blutglukosespiegels über den ganzen Versuch im postischämischen Arm hinweg zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Kanülierung der Femoralarterie), 2 (prä Bac) und 3 (Versuchsende).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	Messzeitpunkt
90,69	80,07	81,25	Verum-Gruppe
95,58	92,30	93,38	Kontrollgruppe

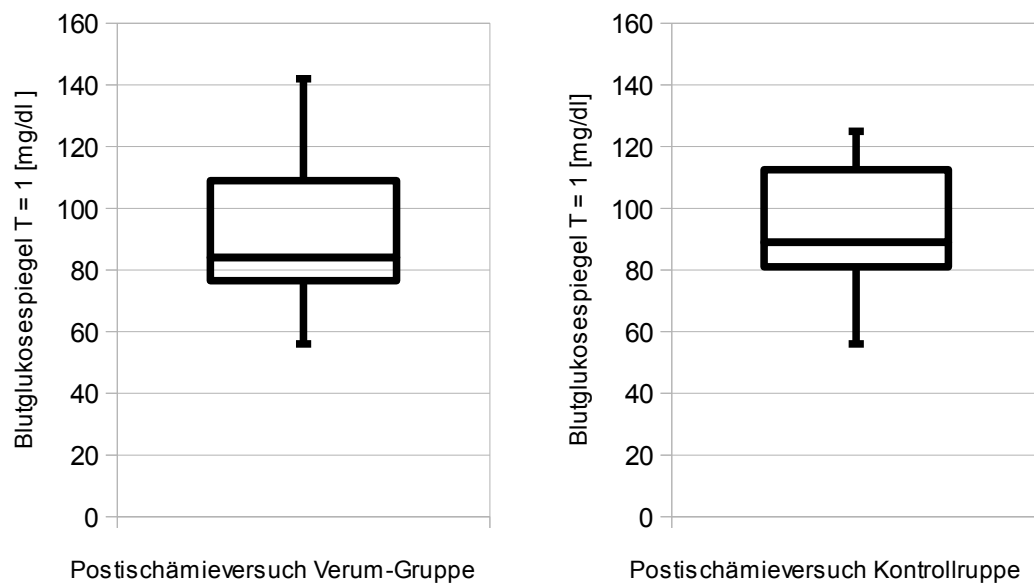


Abb. 49a

Standardabweichung: 22,26 vs. 20,62

Minimum: 56 vs. 56

Unteres Quartil: 76,5 vs. 81

Median: 84 vs. 89

Oberes Quartil: 109 vs. 112,5

Maximum: 142 vs. 125

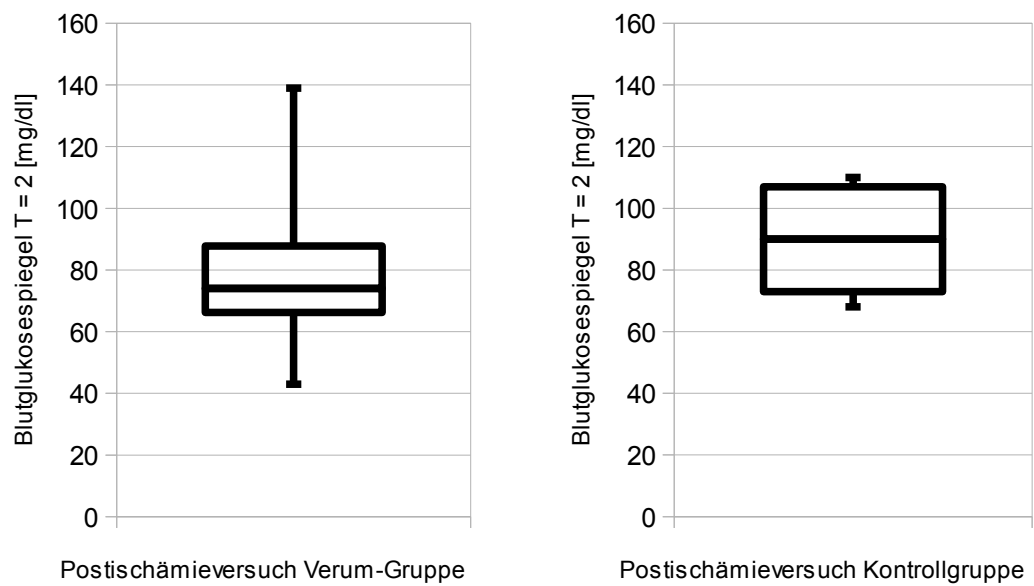


Abb. 49b

Standardabweichung: 27,45 vs. 18,80

Minimum: 43 vs. 68

Unteres Quartil: 66,25 vs. 73

Median: 74 vs. 90

Oberes Quartil: 87,75 vs. 107

Maximum: 139 vs. 110

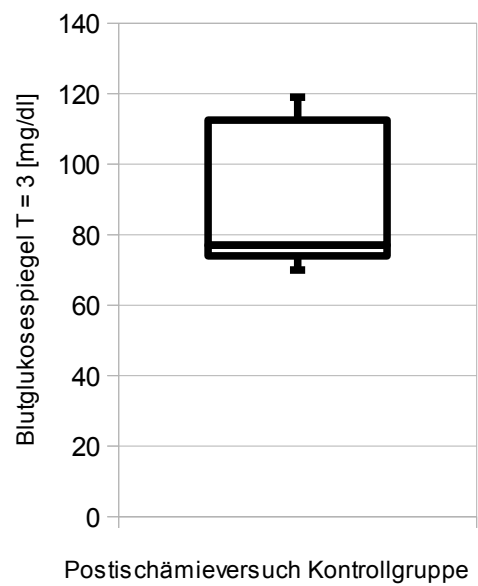
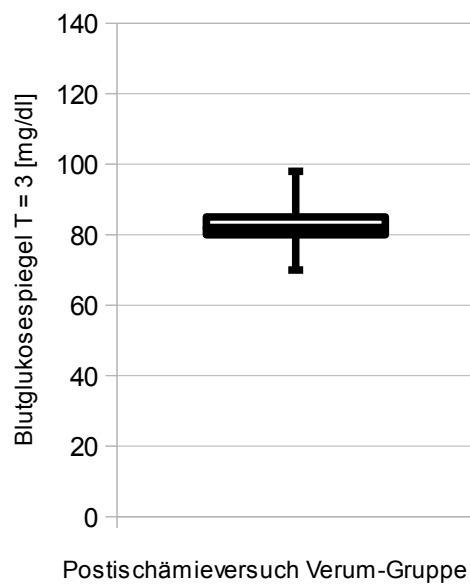


Abb. 49c

Standardabweichung: 7,88 vs. 21,41

Minimum: 70 vs. 70

Unteres Quartil: 80 vs. 74

Median: 82 vs. 77

Oberes Quartil: 85 vs. 112,5

Maximum: 98 vs. 119

3.6 Kohlendioxid-Partialdruck ($p\text{CO}_2$)

Präischämiegruppe. Im hier beschriebenen Versuch mit nur $1\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ Baclofen keine ausgeprägte Hyperkapnie zu beobachten. Im Gegenteil: Die Verum-Gruppe hat während des gesamten Experiments Kohlendioxidpartialdrucke, die im Mittel unterhalb denen der Kontrollgruppe liegen. Zu Beginn ist dieser Unterschied noch nicht signifikant ($p=0,163$), zum Versuchsende hin jedoch ist der $p\text{CO}_2$ der präischämischen Verum-Gruppe signifikant erniedrigt ($p=0,013$). In der Verum-Gruppe liegen die Werte des $p\text{CO}_2$ zwischen 31 und 45mmHg (T=1), 26 und 46mmHg (T=2), 35 und 51mmHg (T=3), 23 und 81mmHg (T=4), 28 und 52mmHg (T=5) sowie 40 und 50mmHg (T=6). In der Kontrollgruppe liegen die Werte des $p\text{CO}_2$ zwischen 31 und 48mmHg (T=1), 31 und 50mmHg (T=2), 39 und 62mmHg (T=3), 41 und 62mmHg (T=4), 42 und 71mmHg (T=5) sowie 43 und 62mmHg (T=6).

Postischämiegruppe. Auch hier liegen die Daten der Verum-Gruppe fast ausnahmslos (bis auf T=5) unterhalb der Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede ergeben sich jedoch nicht, weder zu Versuchsbeginn ($p=0,399$) noch zu Versuchsende ($p=0,165$). Allerdings scheint sich hier die Beobachtung widerzuspiegeln, dass nach Baclofenapplikation der diesmal höheren Menge ($2\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) durchaus eine relevante $p\text{CO}_2$ -Erhöhung von im Mittel 38,71mmHg auf 49,92mmHg zu verzeichnen ist. Diese Beobachtung deckt sich also mit der Hyperkapnie der Verum-Gruppe im präischämischen Arm nach Baclofenapplikation bei Herrn Ludolph, welche für eine höhere Zellschädigung verantwortlich gemacht wird, mit der Einschränkung, dass diese Bewegung auch in der Kontrollgruppe vollzogen wird.

In der Verum-Gruppe liegen die Werte zwischen 32 und 55mmHg (T=1), 27 und 44mmHg (T=2), 18 und 50mmHg (T=3), 28 und 60mmHg (T=4), 27 und 74mmHg (T=5) sowie 35 und 61mmHg (T=6). In der Kontrollgruppe liegen die Werte des $p\text{CO}_2$ zwischen 33 und 52mmHg (T=1), 30 und 51mmHg (T=2), 20 und 46mmHg (T=3), 35 und 58mmHg (T=4), 41 und 58mmHg (T=5) sowie 38 und 74mmHg (T=6).

Die Darstellung der Mittelwerte wurde in den nachfolgenden Diagrammen vorgenommen (Abb. 50 und Abb. 51).

In Form von Boxplots wurden zu Beginn (T=1, Abb. 50a) und zum Ende des Präischämie-Versuchs (T=6, Abb. 50b) sowie zu Beginn und Ende des Postischämieversuchs (Abb. 51a und b) die Kohlendioxidpartialdrücke dargestellt und zueinander in Bezug gesetzt.

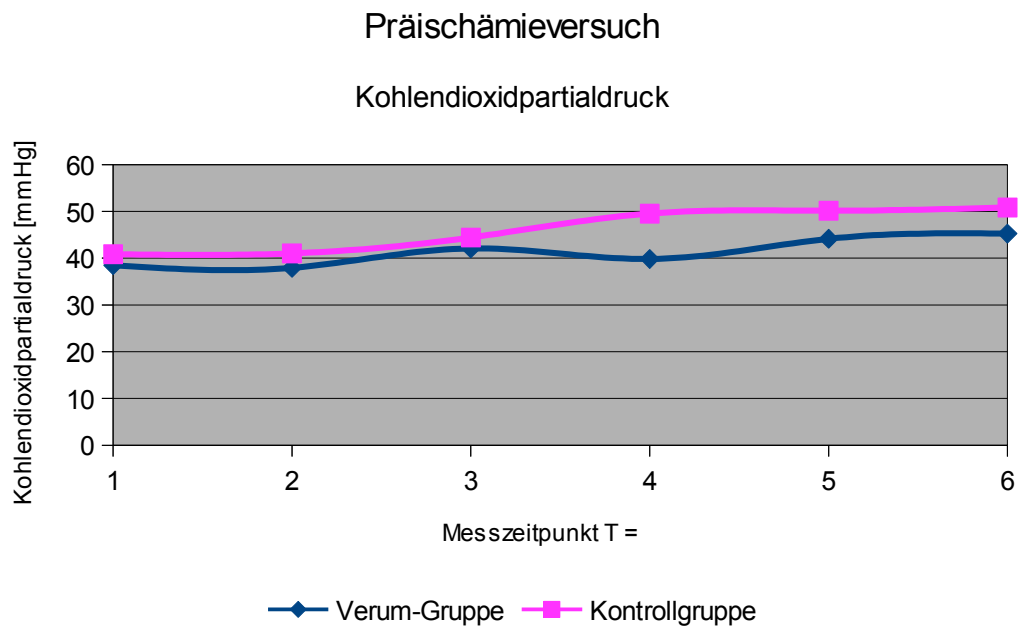
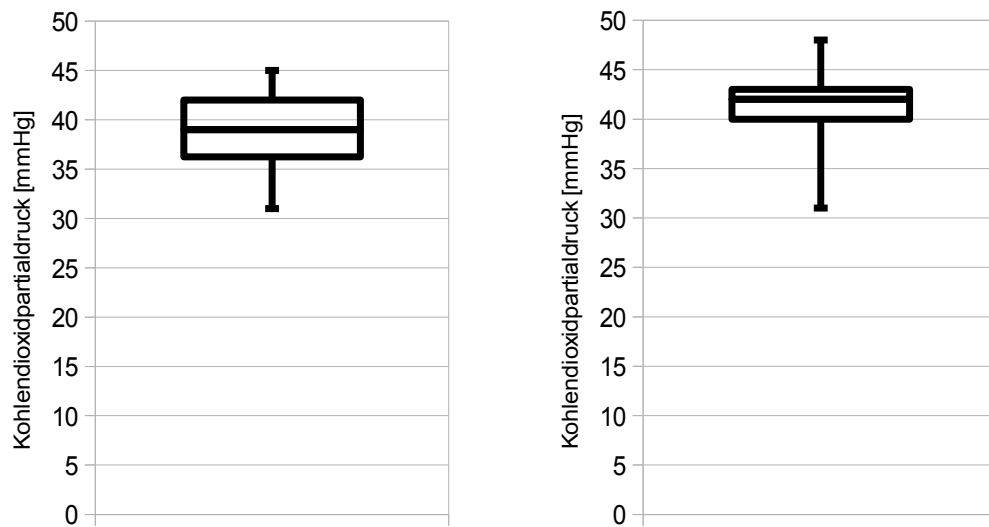


Abb. 50: Mittelwerte der $p\text{CO}_2$ -Werte im präischämischen Versuchsarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Einbringen des Katheters in die A. femoralis), 2 (bei Verschluss der Aa. carotides communes), 3 (5min nach Verschluss der Aa. carotides communes), 4 (10min nach Verschluss der Aa. carotides communes, also direkt postischämisch), 5 (30min post 4VO) und 6 (60min post 4VO, Versuchsende).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	4	5	6	Messzeitpunkte
38,50	37,92	42,08	39,82	44,13	45,25	Verum-Gruppe
40,84	41,02	44,41	49,53	50,15	50,83	Kontrollgruppe



Verum-Gruppe zu Beginn des Präischämieversuchs Kontrollgruppe zu Beginn des Präischämieversuchs

Abb. 50a

Standardabweichung: 4,36 vs. 4,38

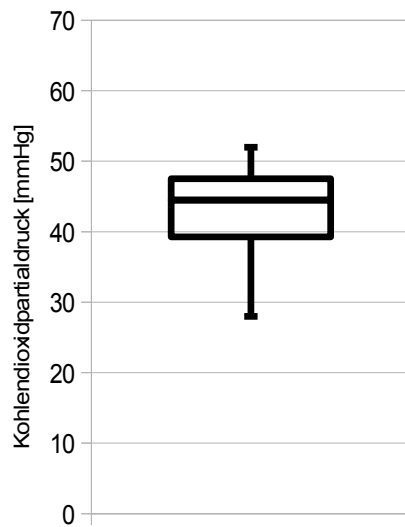
Minimum: 31 vs. 31

Unteres Quartil: 36,25 vs. 40

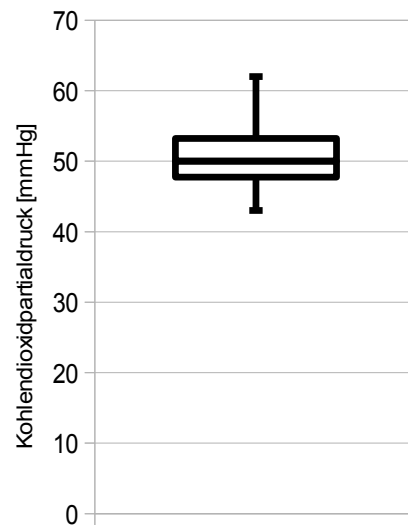
Median: 39 vs. 42

Oberes Quartil: 42 vs. 43

Maximum: 45 vs. 48



Verum-Gruppe zum Ende des Präischämieversuchs



Kontrollgruppe zum Ende des Präischämieversuchs

Abb. 50b

Standardabweichung:	7,09 vs. 5,52
Minimum:	28 vs. 43
Unteres Quartil:	39,25 vs. 47,75
Median:	44,5 vs. 50
Oberes Quartil:	47,5 vs. 53,25
Maximum:	52 vs. 62

Postischämieversuch

Kohlendioxidpartialdruck

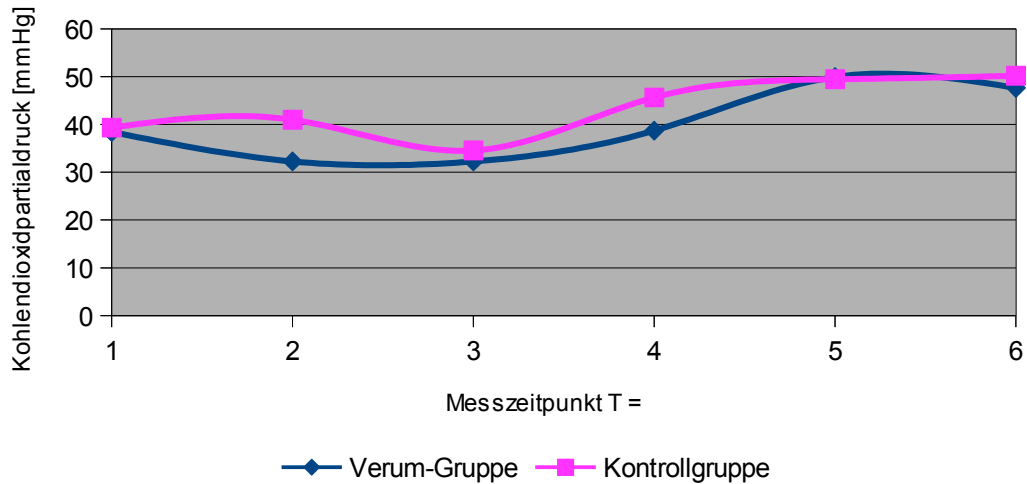
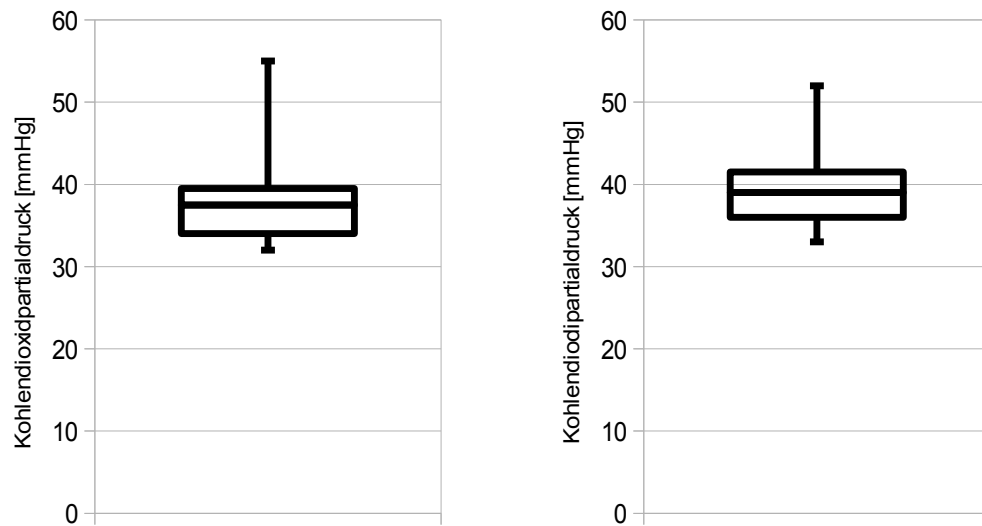


Abb. 51: Mittelwerte der $p\text{CO}_2$ -Werte im postischämischen Versuchsarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Einbringen des Katheters in die A. femoralis), 2 (bei Verschluss der Aa. carotides communes), 3 (5min nach Verschluss der Aa. carotides communes), 4 (direkt vor Baclofenapplikation, also 30min post 4VO), 5 (nach Baclofenapplikation, 60min post 4VO) und 6 (90min post 4VO, Versuchsende).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	4	5	6	Messzeitpunkte
38,40	32,25	32,25	38,71	49,92	47,63	Verum-Gruppe
39,33	40,96	34,55	45,64	49,44	50,15	Kontrollgruppe



Verum-Gruppe zu Beginn des Postischämieversuchs Kontrollgruppe zu Beginn des Postischämieversuchs

Abb. 51a

Standardabweichung: 5,51 vs. 5,11

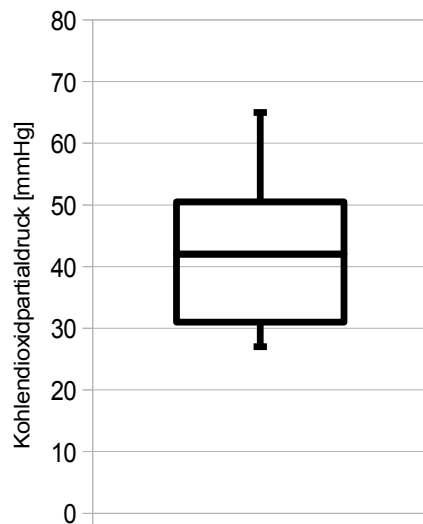
Minimum: 32 vs. 33

Unteres Quartil: 34 vs. 36

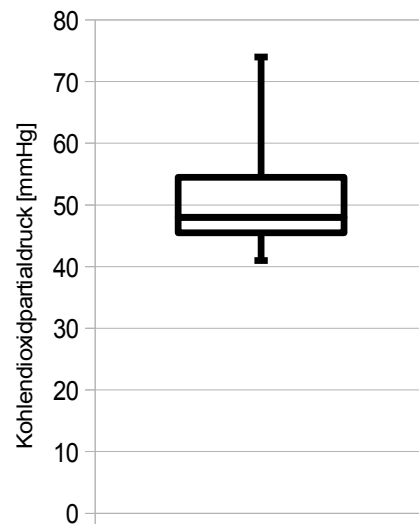
Median: 37,5 vs. 39

Oberes Quartil: 39,5 vs. 41,5

Maximum: 55 vs. 52



Verum-Gruppe zum Ende des Postischämieversuchs



Kontrollgruppe zum Ende des Postischämieversuchs

Abb. 51b

Standardabweichung: 12,57 vs. 11,43

Minimum: 27 vs. 41

Unteres Quartil: 31 vs. 45,5

Median: 42 vs. 48

Oberes Quartil: 50,5 vs. 54,5

Maximum: 65 vs. 74

3.7 Sauerstoff-Partialdruck (pO_2)

Zu allen Zeitpunkten ist der pO_2 der Kontrollgruppe sowie der Verum-Gruppe – in beiden Versuchsarmen – deutlich über 60mmHg. Der niedrigste pO_2 -Wert tritt bei der postischämischen Applikations zum Zeitpunkt T6 in der Verumgruppe auf. Insbesondere zu den Zeitpunkten der Ischämie und der Baclofenapplikation befindet sich der pO_2 in einem Bereich, in dem auf der O_2 -Bindungskurve eine Sättigung von über 97% postuliert wird. pO_2 -Schwankungen ab 60mmHg werden mit einer dann anzunehmenden O_2 -Sättigung von über 90% als nicht relevant erachtet.

Der Verlauf ist parallelverschoben: Im Präischämie-Arm zeigt sich über den ganzen Versuch hinweg bei allen Tieren ein kontinuierlicher Abfall des O_2 -Partialdruckes um 14,58mmHg vom Beginn des Experiments bis zum Ende (präischämischer Arm, Verum-Gruppe), um 33,49mmHg (präischämischer Arm, Kontrollgruppe) und um 35,84mmHg (postischämischer Arm, Verumgruppe).

Eine Ausnahme bildet die Kontrollgruppe des postischämischen Armes: Hier findet sich zwar auch ein globaler Abfall um 7,13mmHg, jedoch ist der Abfall mit einem lokalen Minimum bei T=4 mit 27,87mmHg deutlich größer; hiernach erholt sich der pO_2 wieder, um zum Versuchsende zu einem Mittelwert von 153,88mmHg mit oben beziffertem globalen Abfall zu kommen.

Die Darstellung der Mittelwerte wurde in den nachfolgenden Diagrammen vorgenommen (Abb. 52 und Abb. 53).

In Form von Boxplots wurden zu Beginn (T=1, Abb. 52a) und zum Ende des Präischämie-Versuchs (T=6, Abb. 52b) sowie zu Beginn und Ende des Postischämieversuchs (Abb. 53a und b) die Sauerstoffpartialdrücke dargestellt und zueinander in Bezug gesetzt.

Präischämieversuch

Sauerstoffpartialdruck

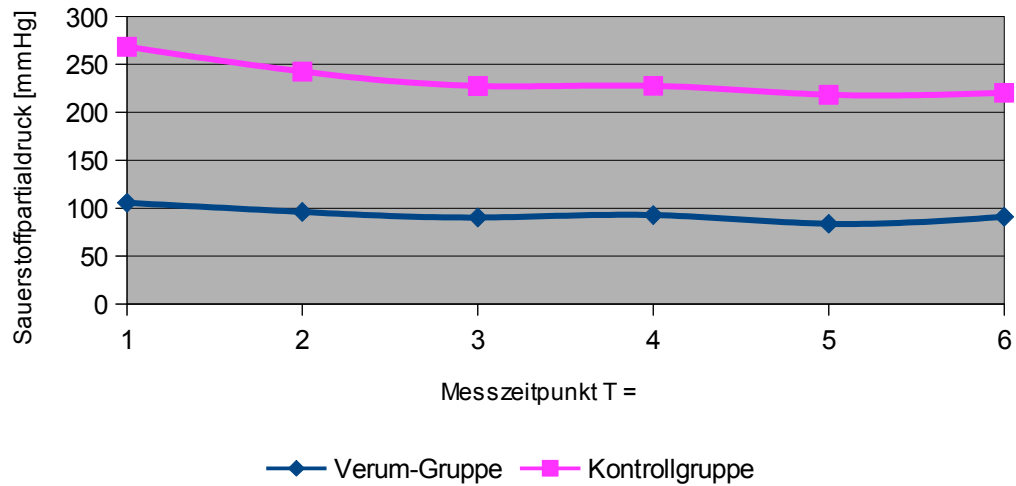
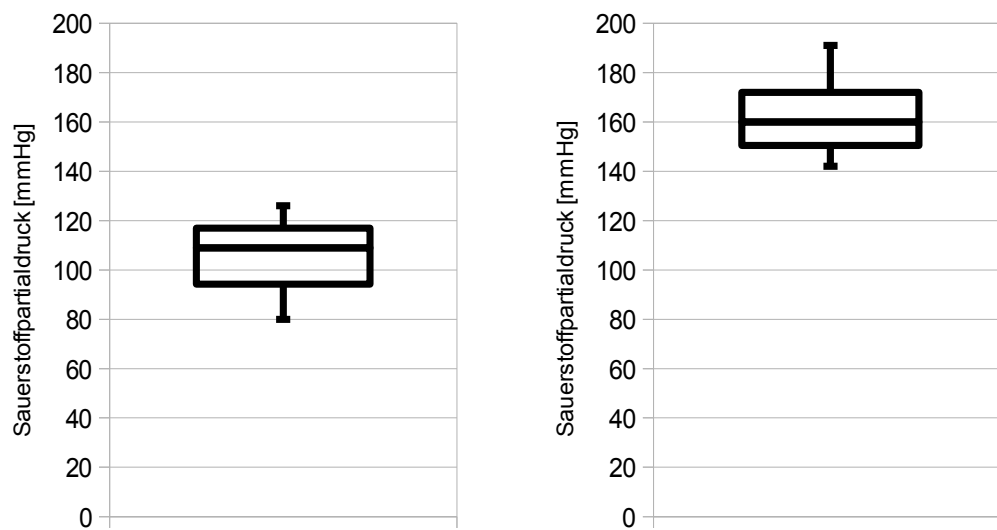


Abb. 52: Mittelwerte der pO_2 -Werte im präischämischen Versuchsarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Einbringen des Katheters in die A. femoralis), 2 (bei Verschluss der Aa. carotides communes), 3 (5min nach Verschluss der Aa. carotides communes), 4 (10min nach Verschluss der Aa. carotides communes, also direkt postischämisch), 5 (30min post 4VO) und 6 (60min post 4VO, Versuchsende).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	4	5	6	Messzeitpunkte
105,58	96,08	90,25	92,82	83,75	91,00	Verum-Gruppe
162,88	146,45	137,25	134,84	134,59	129,39	Kontrollgruppe



Verum-Gruppe zu Beginn des Präischämieversuchs Kontrollgruppe zu Beginn des Präischämieversuchs

Abb. 52a

Standardabweichung: 15,58 vs. 15,31

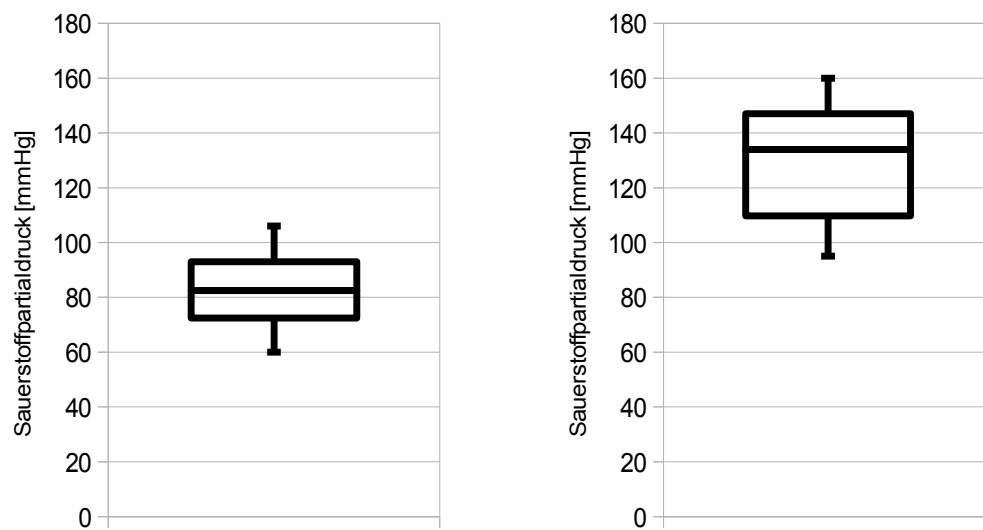
Minimum: 80 vs. 142

Unteres Quartil: 94,25 vs. 150,5

Median: 109 vs. 160

Oberes Quartil: 117 vs. 172

Maximum: 126 vs. 191



Verumgruppe zum Ende des Präschämieversuches Kontrollgruppe zum Ende des Präschämieversuchs

Abb. 52b

Standardabweichung: 15,27 vs. 22,69

Minimum: 60 vs. 95

Unteres Quartil: 72,5 vs. 109,75

Median: 82,5 vs. 134

Oberes Quartil: 93 vs. 147

Maximum: 106 vs. 160

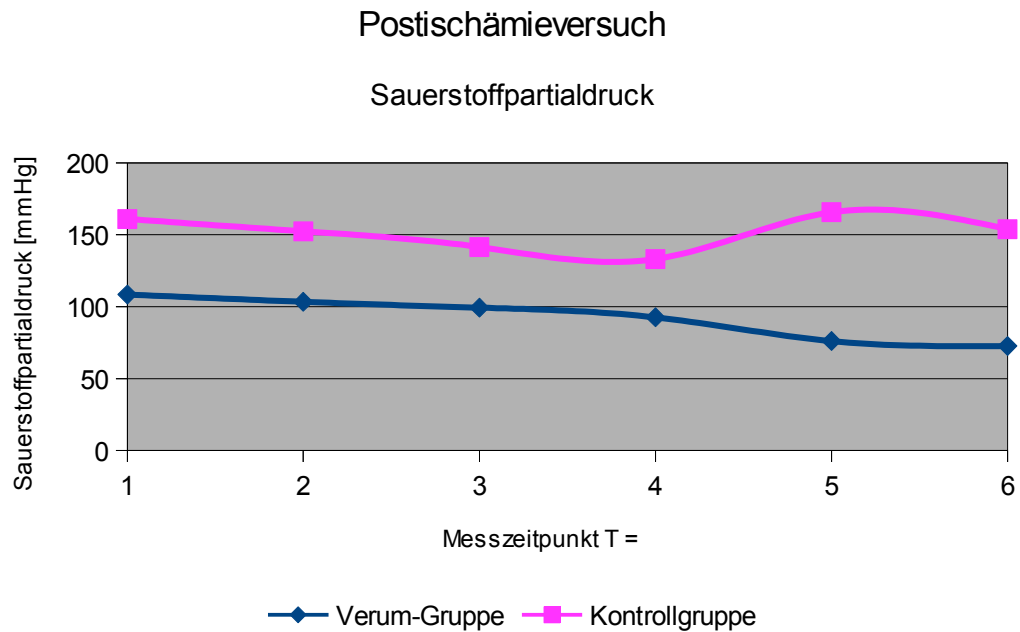
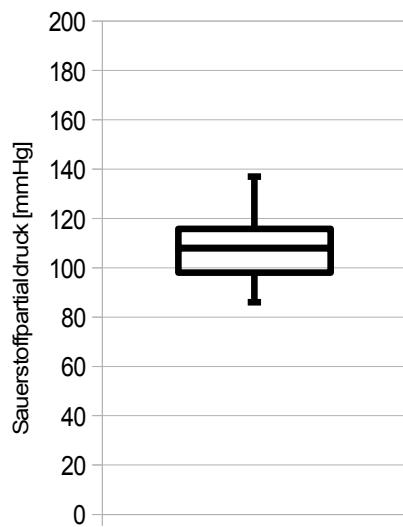


Abb. 53: Mittelwerte der pO_2 -Werte im postischämischen Versuchsarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Einbringen des Katheters in die A. femoralis), 2 (bei Verschluss der Aa. carotides communes), 3 (5min nach Verschluss der Aa. carotides communes), 4 (direkt vor Baclofenapplikation, also 30min post 4VO), 5 (nach Baclofenapplikation, 60min post 4VO) und 6 (90min post 4VO, Versuchsende).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	4	5	6	Messzeitpunkte
108,47	103,38	99,31	92,57	76,08	72,63	Verum-Gruppe
161,01	152,43	141,51	133,14	165,69	153,88	Kontrollgruppe



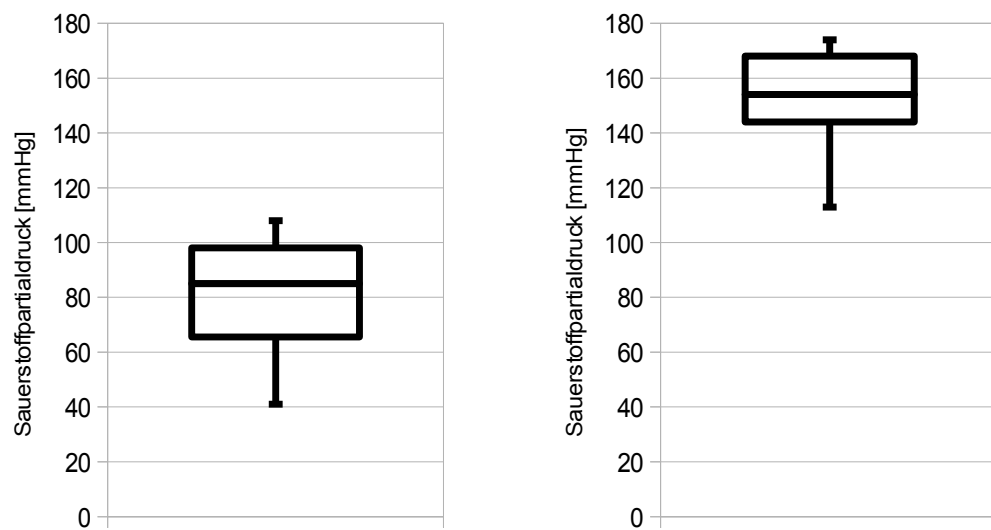
Verum-Gruppe zu Beginn des Postischämieversuchs



Kontrollgruppe zu Beginn des Postischämieversuchs

Abb. 53a

Standardabweichung: 12,82 vs. 5,11
 Minimum: 88 vs. 118
 Unteres Quartil: 98 vs. 153
 Median: 108 vs. 159
 Oberes Quartil: 115,75 vs. 174
 Maximum: 137 vs. 185



Verum-Gruppe zum Ende des Postischämieversuchs Kontrollgruppe am Ende des Postischämieversuchs

Abb. 53b

Standardabweichung: 19,46 vs. 20,77

Minimum: 41 vs. 113

Unteres Quartil: 65,5 vs. 144

Median: 85 vs. 154

Oberes Quartil: 98 vs. 168

Maximum: 108 vs. 174

3.8 pH

Eine wesentliche Beobachtung ist, dass der pH-Wert global in allen Versuchsreihen mit dem Fortgang der Operation und somit Narkosedauer absinkt: Die Tiere werden azidotisch. Diese Azidose ist in der Hauptsache metabolisch bedingt (Postaggressionsstoffwechsel, anaerober Metabolismus, Laktatazidose), und wird versucht, respiratorisch zu kompensieren.

Der pH steht über die HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung in reziproker Korrelation zum arteriellen $p\text{CO}_2$. Je größer der $p\text{CO}_2$, desto niedriger der pH, weil der Anteil der dissoziierten Säure H^+ erhöht ist, ebenso wie der des HCO_3^- (Bikarbonat, korrespondierende Base). Auch dieses Verhältnis findet sich in den Diagrammen (Abb. 54 und Abb. 55).

Die pH-Werte der Verum- und Kontrollgruppe verlaufen weitestgehend gleichförmig und haben postischämisch keinen signifikanten Unterschied. Präischämisch zeigt sich beim Ausgangswert bereits ein Signifikanzniveau von $p=0,009$, um das der pH in der Kontrollgruppe erniedrigt ist. Dieses Verhältnis kehrt sich im Verlauf allerdings mehrfach wieder um. In der präischämischen Verumgruppe zeigen sich zwei lokale Extrema, nämlich ein lokales Maximum bei $T=4$ sowie ein lokales Minimum bei $T=5$: Hierfür zeichnen am ehesten Ausreißer bei T_4 ($\text{pH}=7,56$) und bei T_5 ($\text{pH}=6,58$) verantwortlich, die bei der geringen Größe der Stichproben stark ins Gewicht fallen.

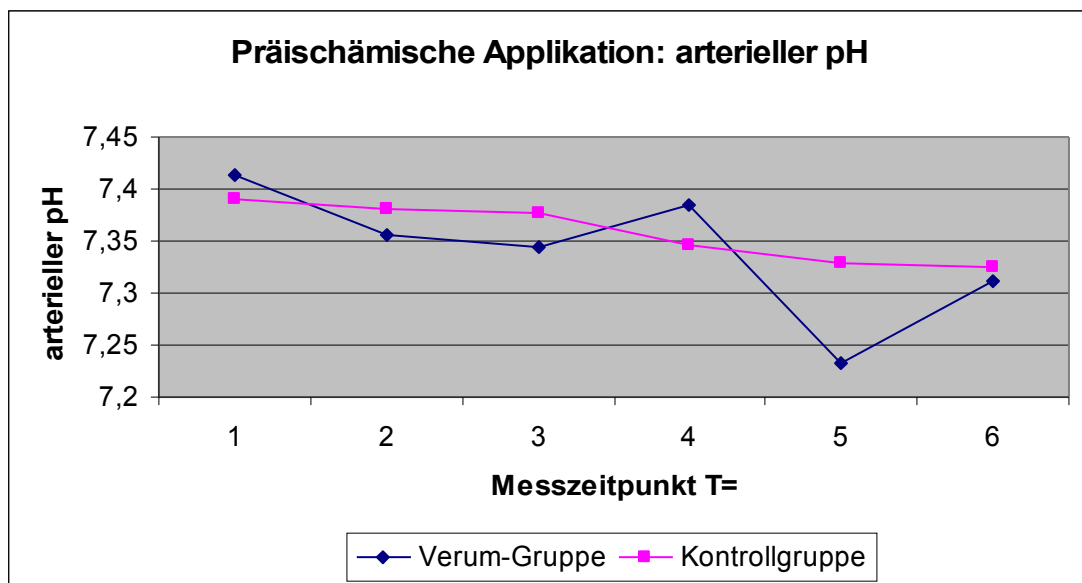


Abb. 54: Mittelwerte des pH im präischämischen Versuchsarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Einbringen des Katheters in die A. femoralis), 2 (bei Verschluss der Aa. carotides communes), 3 (5min nach Verschluss der Aa. carotides communes), 4 (10min nach Verschluss der Aa. carotides communes, also direkt postischämisch), 5 (30min post 4VO) und 6 (60min post 4VO, Versuchsende).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	4	5	6	Messzeitpunkte
7,41	7,36	7,34	7,39	7,23	7,31	Verum-Gruppe
7,39	7,38	7,38	7,35	7,33	7,33	Kontrollgruppe

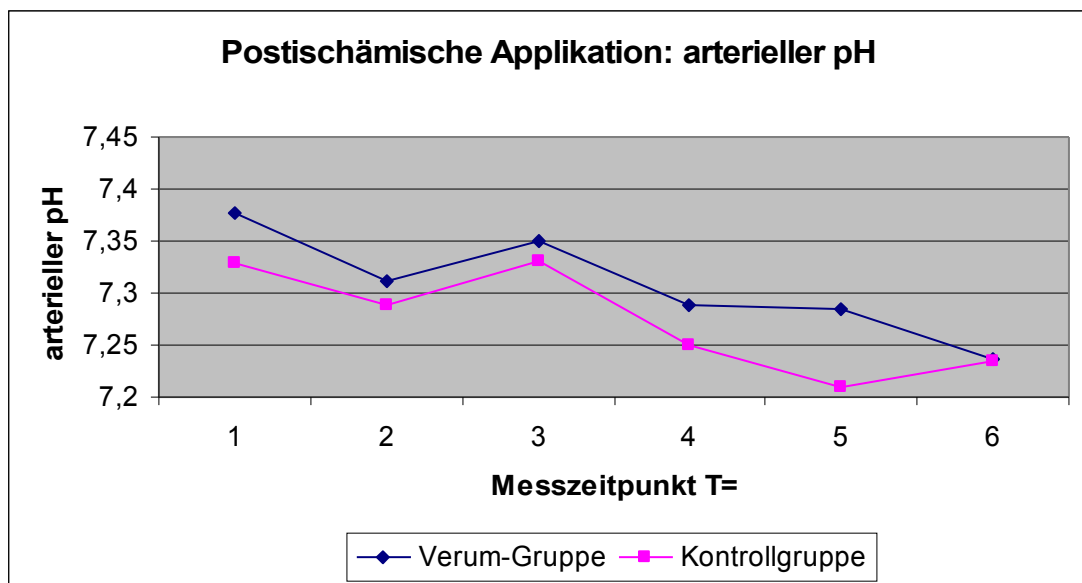


Abb. 55: Mittelwerte des pH im postischämischen Versuchsarm zu den aus dem Schema (Abb. 33) ersichtlichen Zeitpunkten 1 (Einbringen des Katheters in die A. femoralis), 2 (bei Verschluss der Aa. carotides communes), 3 (5min nach Verschluss der Aa. carotides communes), 4 (direkt vor Baclofenapplikation, also 30min post 4VO), 5 (nach Baclofenapplikation, 60min post 4VO) und 6 (90min post 4VO, Versuchsende).

Die Werte sind im Einzelnen:

1	2	3	4	5	6	Messzeitpunkte
7,38	7,31	7,35	7,29	7,28	7,24	Verum-Gruppe
7,33	7,29	7,33	7,25	7,21	7,23	Kontrollgruppe

3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Zahl der geschädigten Zellen im präischämischen Applikationsmodus ist in der Verum-Gruppe, also mit 1µg Baclofen, signifikant größer ($p=0,021$) als in der Plazebo-Gruppe. Dieses Ergebnis erreicht Signifikanzniveau und ist daher noch ausgeprägter als in der Arbeit von Ludolph, wo das Signifikanzniveau bei $p=0,1$ lag und die höhere Zellschädigung als Trend erfasst wurde.
2. Die Schädigungsdiskrepanz im postischämischen Applikationsmodus erreicht kein Signifikanzniveau ($p=0,093$). Die Ausprägung der Schädigung über die Gruppen ist im Großen und Ganzen ausgeglichen. In diesem Punkt deckt sich das Ergebnis mit der Arbeit von Ludolph.
3. In beiden Versuchsarmen ist der MABP ab Baclofenapplikation bis zum Versuchsende signifikant erniedrigt.
4. Die Rektaltemperatur kann in beiden Versuchsarmen bei allen Tieren über den Zeitraum des gesamten Versuchs hinweg zwischen 36,5 und 37,5°C konstant gehalten werden. Die intrakranielle Temperatur, angenähert durch eine Messung im Temporalmuskel, kann in beiden Versuchsarmen über den Zeitraum des gesamten Versuchs hinweg zwischen 36,6 und 37,2°C konstant gehalten werden.

5. Während der Blutglukosespiegel im präischämischen Arm vor der Baclofenapplikation ($p=0,045$) und am Versuchsende ($p=0,041$) signifikant erniedrigt ist, besteht im postischämischen Arm zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied.
6. Im präischämischen Versucharm ist der $p\text{CO}_2$ des Blutes nicht signifikant verändert und zeigt am Versuchsende eher eine Erniedrigung des $p\text{CO}_2$ in der Verum-Gruppe, die signifikant ist ($p=0,013$). Keine signifikanten Unterschiede des Kohlendioxidpartialdruckes weist der postischämische Versucharm auf. Die pH-Werte zeigen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede, weder im Verum- noch im Kontrollarm.
7. Das in dieser Versuchsanordnung verwendete Tiermodell ist in der Lage, reproduzierbare Ergebnisse im 4-Gefäßverschlussmodell bei der Ratte zu liefern.

4 Diskussion

4.1 Wahl der Versuchstiere

Von der Größe her soll genau die Tierart ausgewählt werden, bei der das geplante Experiment eben noch unter Einsatz größter zur Verfügung stehender Technik durchgeführt werden kann. Konkret bedeutet dies, dass die vom Versuch affizierten kleinsten Strukturen, in unserem Falle die Vertebralarterien, ausreichend gut darstellbar sein müssen.

Viele Tiermodelle der zerebralen Ischämie sind unzureichend, da Jungtiere herangezogen werden, und nicht etwa gealterte Tiere, die entsprechende Komorbiditäten, allen voran Atherosklerose, aufweisen. Wahlgren sieht darin sogar die Ursache, dass *de facto* bislang noch nicht ein einziges potentes neuroprotektives Pharmakon in den klinischen Alltag eingeführt wurde. Von der Idee, ein nebenwirkungsarmes Notfallmedikament bereitzustellen, das dem Patienten unkompliziert noch vor Ort im engen Zeitfenster nach dem Ereignis appliziert werden könnte, ist man noch weit entfernt [57].

In einem Artikel aus dem Jahre 1996, in dem die neurotoxische Wirkung des NMDA-Antagonisten MK-801 auf bestimmte kortikale Regionen (Cingulum und Retrosplenium) des Nagers untersucht wird, stellt sich heraus, dass die Schädigung einerseits sehr vom Geschlecht abhängt, aber vor allem auch vom Alter: Der Anteil geschädigter Neurone bei den weiblichen Jungtieren ist sechsmal so hoch wie der bei den männlichen Jungtieren. Während im Alter sich bei den weiblichen Tieren der Anteil der Schädigungen verandert halbfacht, ist bei den männlichen Ratten lediglich ein kaum messbarer Zuwachs zu verzeichnen. Die Unterschiede zwischen Rattenarten, hier Sprague-Dawley und Wistar, sind nicht signifikant [58].

4.2 Operationstechnik

4.2.1 Anästhesie

Die Schnitt-Naht-Zeit pro Eingriff, so also auch die Narkosedauer, beträgt etwa sechs Stunden inklusive Monitoring der Blutglukosewerte und der Blutgase postoperativ und Verschluss der A. femoralis.

Allerdings haben die Narkosemittel selbst zentrale Effekte: Eine Arbeit aus dem Jahre 1990 stellt heraus, dass der größte neuroprotektive Effekt unter der Narkose wohl dem Temperaturabfall zuzuschreiben sei, die Anästhesie selbst, hier mit Equithesin, ebenfalls einen protektiven Effekt auf den Neuronenschaden habe [60].

Fünf Jahre später zeigt eine Arbeit aus Iowa, dass Anästhesien mit Halothan und Isofluran sehr wohl einen Einfluss auf die zerebralen Energiespeicher (Adenosintri- und -diphosphate) zum Zeitpunkt der postischämischen kortikalen Depolarisation haben – ungewiss allerdings bleibt hier der genaue Effekt auf das Ausmaß der neuronalen Schädigung [61].

Daher wurde darauf geachtet, Dauer und der Tiefe der Narkose zu standardisieren.

4.2.2 Intraoperativer Blutverlust und Flüssigkeitshaushalt

Ratten haben ein intravasales Blutvolumen von etwa 60ml/kg Körpergewicht [62]. Die hier verwendeten Tiere haben also ein zirkulatorisches Blutvolumen von etwa 15 bis 21ml. Zur Verringerung des operationsbedingten Blutverlustes ist umsichtiges und vorsichtiges Präparieren erforderlich. Blutende Gefäße, besonders bei Muskelinzisionen, dem Spalten der Gl. thyreoidea und dem Abheben der Galea vom Schädeldach, können bei Bedarf mit einem

Elektrokauter verödet werden oder mit dem gerinnungsaktiven Wasserstoffperoxid thrombosiert werden.

4.2.3 Rektaltemperatur / Intrakranielle Temperatur

Intrakranielle Temperaturabfälle von 4-5°C inтраischämisch sind beschrieben [63-65]. Daher erfolgt eine Temperaturkorrektur durch eine Rotlicht-Lampe und ein Heizkissen, wohlwissend, dass das Erhitzen des Gehirns zur Beibehaltung der Normothermie während der Ischämie die zerebrale Schädigung bei der Ratte vergrößern kann [66]. Es gibt eine ganze Reihe von Literaturstellen, in denen die Abträglichkeit der peripheren Hyperthermie für das Outcome von zerebralen Läsionen belegt wird [63, 67-71].

Als Grund hierfür wird eine Zunahme der Störung der Blut-Hirn-Schranke bei Hyperthermie diskutiert [72].

Eine Hypothermie hat *per se* ebenfalls einen vielfach nachgewiesenen Effekt: Die im Vergleich zum Körper niedrigere Temperatur verschont die Neurone in teilweise beträchtlichem Ausmaß vor den Folgen der Ischämie. Diese Ergebnisse finden sich bereits bei geringgradigen Hypothermien [73-75]. Friedman et al. diskutieren, dass eine inтраischämische, allerdings beträchtliche Hypothermie von 30°C, eine nicht-selektive Downregulation von NMDA- und AMPA-Rezeptoren verhindert, wodurch weiterhin Ca^{2+} nach extrazellulär befördert würde und keine Gelegenheit hat, zytotoxisch zu wirken [76].

Die intrakranielle Temperatur kann mittels Messung der Rektaltemperatur nur unzureichend kontrolliert werden [74, 78]. Eine Sonde im M. temporalis liefert Temperaturen, die gut mit der oberflächlichen Hirntemperatur korrelieren [78].

Bereits durch leichte Schwankungen werden sowohl die Glutamatfreisetzung aus neuronalen Zellen als auch das Wiederaufnahmesystem in Unruhe gebracht [67, 79].

4.2.4 Glukosehaushalt

Eine intranschämische Hyperglykämie hat eine deutliche Aggravation der ischämischen Zellläsion zur Folge [80-84].

In unserer Versuchsreihe sind die Werte der Postischämiegruppe zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich. Die der Präischämiegruppe zeigen jedoch signifikante Differenzen zum 2. (vor Baclofengabe) und 3. Messzeitpunkt (Versuchsende), wobei die Kontrollgruppe jeweils oberhalb der Verumgruppe liegt, so dass folglich, falls überhaupt, auch die Kontrollgruppe eine stärkere Schädigung erfahren müsste. Tatsächlich liegen die mittleren arteriellen Blutglukosewerte mit 88,17mg/dl in der Verum-Gruppe und 109,40mg/dl in der Kontrollgruppe (T=2) bzw. 84,67mg/dl in der Verum-Gruppe und 109,90mg/dl in der Kontrollgruppe (T=3) im Normbereich für Wistar-Ratten. Die Unterschiede sind deutlich geringer als in den Glukose-Belastungs-Experimenten, aus denen die Ergebnisse der höheren Schädigung durch Hyperglykämie stammen. Daher ist die Annahme gerechtfertigt, dieser Störfaktor sei im Rahmen des Experiments nicht erheblich.

4.2.5 Blutgase

Präischämischer Versucharm.

Wie bereits erwähnt, liegen die Kohlendioxidpartialdrucke der Kontrollgruppe stets über denen der Verum-Gruppe. Während die pCO₂-Werte in der Kontrollgruppe stationär bleiben und

erwartungsgemäß ein Anstieg 5 Minuten nach Beginn der Ischämie zu verzeichnen ist, der auf Werte um 50mmHg ansteigt, um postischämisch etwa auf diesem Niveau zu verharren, verhalten sich die $p\text{CO}_2$ -Werte der Verum-Gruppe durchaus nicht erwartungsgemäß: Die Daten von Alexander Ludolph legen Nahe, dass die Baclofen-Applikation von 1,5 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ eine Hyperkapnie verursacht ($p=0,003$). Im hier beschriebenen Versuch mit nur 1 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ Baclofen ist erwartungsgemäß und stimmig mit der Hypothese von Herrn Ludolph keine ausgeprägte Hyperkapnie mehr zu beobachten.

Der pH-Verlauf zeigt einen eindeutigen Trend. Dieser korreliert gut mit dem gemessenen $p\text{CO}_2$ -Verlauf, zu dem er, grob gesprochen, in reziprokem Verhältnis steht.

Hierzu passend, aber nicht in direkter Abhängigkeit, verhält sich der $p\text{O}_2$ -Verlauf, der kontinuierlich abfällt. Diese Beobachtung stimmt für die Kontrollgruppe wie auch für die Verum-Gruppe. Die bereits erwähnte Parallelverschiebung, die einen systematischen Fehler vermuten lässt, ist in der Praxis nicht relevant: Die Sauerstoffbindungskurve (oder O_2 -Dissoziationskurve) hat einen S-förmigen Verlauf. Bei einem angenommenen pH von 7,4 und einem $p\text{CO}_2$ von 40mmHg hat die O_2 -Bindungskurve einen zunächst nicht ganz so steilen, dann aber ab 20mmHg sehr steil ansteigenden Verlauf. Kleinste Änderungen des $p\text{O}_2$ haben hier einen großen Einfluss auf die O_2 -Sättigung. Beträgt die O_2 -Sättigung bei 20mmHg noch 36%, so nimmt sie bei 10mmHg ab auf 13% und steigt bei 30mmHg an auf 58%. Anders ist die Situation bei 60mmHg, wo die O_2 -Sättigung 90% beträgt. Selbst ein Abfall auf 50mmHg zieht nur eine Verminderung der O_2 -Sättigung auf 84% nach sich – immer noch ausreichend für eine gute Gewebeversorgung mit O_2 , ein Anstieg auf 70mmHg bewirkt eine O_2 -Sättigung von 93%, [85]. Man darf also postulieren, dass die O_2 -

Sättigung bei allen Versuchstieren zu jedem Zeitpunkt über 90% beträgt, was einer ausgezeichneten Gewebeversorgung mit O₂ entspricht. Insbesondere während der Ischämie und der Baclofenapplikation wird eine O₂-Sättigung von 96% nicht unterschritten.

Postischämischer Versuchsaarm.

Auch hier zeigt sich ein bedeutsamer Unterschied im Verlauf des Kohlendioxidpartialdruckes: Zum Zeitpunkt 4, also nach dem 4VO, ist es durch den intraischämischen Stress in beiden Gruppen bereits zu einem Anstieg gekommen. In der Verum-Gruppe liegt der Wert nun bei 38,71mmHg, in der Kontrollgruppe mit 45,64mmHg etwas höher. Der Anstieg nach Baclofengabe lässt hier in der Verum-Gruppe wiederum eine ausgeprägte Hyperkapnie auffällig werden: Während in der Kontrollgruppe der pCO₂ nur um 4,80mmHg auf 49,44mmHg ansteigt, steigt dieser in der Verum-Gruppe um 11,21mmHg, also in sehr viel stärkerem Maße, auf 49,92mmHg an. Im Nachgang lässt dieser Effekt nach: In der Verum-Gruppe ist die Hyperkapnie leicht rückläufig, während sie in der Kontrollgruppe einen beinahe konstanten Wert beibehält.

Hierzu passend sinkt der pH auf Werte, die deutlich im azidotischen Bereich liegen: Die Kontrollgruppe erreicht post applicationem einen pH von 7,21, die Verum-Gruppe einen pH von 7,28, während die Ausgangs-pH-Werte mit 7,38 (Verum-Gruppe) und 7,33 (Kontroll-Gruppe) in einem für Ratten physiologischen Bereich lagen.

4.3 Wirkungsweise von Baclofen

Zunächst sollen die theoretischen Hintergründe der Neuroprotektion durch Baclofen erörtert werden.

Ein Anstieg der Ca^{2+} -Ionen-Konzentration in intrazellulären Kompartimenten ist *per se* ein Effektor für einen nekrotischen, möglicherweise auch apoptotischen Zelltod während der Ischämie [88, 89]. Lipton belegt in seiner wegweisenden Übersichtsarbeit aus dem Jahre 1999, dass dieses Ion in diesem Zusammenhang auch *in vivo* eine bedeutsame Rolle spielt [88]. Der GABA_B -Rezeptor gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Ist er aktiviert, wird über die G-Proteine die Offenwahrscheinlichkeit für Ca^{2+} -Kanäle vermindert, d. h. der Ca^{2+} -Influx wird vermindert, und es kommt zu einer Verminderung der $[\text{Ca}^{2+}]$ in den Zellen durch den GABA_B -Rezeptor-Agonisten Baclofen und damit zumindest theoretisch zu einer Verringerung der exzitotoxischen Wirkung [3, 89-93], wenngleich eine weitaus potentere Inhibierung des Ca^{2+} -Influxes etwa durch MK-801 gegeben ist [94], einen selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten.

Direkt vermindert Baclofen die Exzitotoxizität durch eine Verringerung der Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt und erreicht so eine reduzierte Wirkung auf den NMDA-Rezeptor nach oben beschriebenem Mechanismus. Hier reiht es sich also in die Gruppe der NMDA-Rezeptor-Antagonisten ein. Unter Exzitotoxizität, erstmalig beschrieben von Olney im Jahr 1969, versteht man den postsynaptisch erhöhten Ca^{2+} -Influx periischämisch mit konsekutiver letaler Akkumulation von Kalziumionen im intrazellulären Kompartiment [96, 97]. Hierauf basiert die Vorstellung, mit $[\text{Ca}^{2+}]$ -reduzierenden Substanzen neuroprotektiv agieren zu können.

Dass Baclofen überhaupt am Zielorgan wirkt, wird durch einen Blutdruckabfall nach Applikation bestätigt. Die Messungen zeigen einen

signifikanten Unterschied des MABP nach Applikation des Pharmakons. Dieser Effekt ist bekannt und beschrieben [98] und bestätigt sich v. a. auch in der klinischen Praxis. Im Rahmen von Transmitterstudien im Ncl. paraventricularis nach intraventrikulärer Baclofenapplikation konnten weiterführende Ergebnisse gefunden werden. Dieser Kern gilt als übergeordnetes Steuerzentrum für die Blutdruckregulation und liegt in unmittelbarer Nähe zu dem Kompartiment, in welches Baclofen bei intraventrikulärer Applikation eingegeben wird. Von daher ist ein Einfluss von Baclofen auf dieses Kerngebiet als wahrscheinlich angesehen worden. In der Tat bestätigt sich in Mikrodialyseuntersuchungen mit anschließender HPLC der bekannte hemmende Einfluss auf die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter wie Glutamat. Die Glutamatkonzentration im PVN beträgt kurzzeitig im Vergleich zur Kontrollgruppe noch 70% und hat sich bereits nach 20min wieder dem Ausgangswert angepasst. Dieser zeitliche Verlauf korreliert sehr gut mit dem beobachteten Blutdruckabfall, der sich ebenfalls nach etwa 20min wieder erholt. Diese kurze Erholung des Blutdrucks wird gefolgt von einer länger anhaltenden Blutdrucksenkung, wozu passend sich im Verlauf von zwei Stunden eine Steigerung der Glycinkonzentration im PVN einstellt. Dieser Anstieg eines inhibitorischen Transmitters ist in der Lage, den Langzeiteffekt von Baclofen intraventrikulär zu erklären. Unverändert bleibt der Aspartatspiegel [2, 99].

4.4 Interpretation der Ergebnisse

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse belegen keinen neuroprotektiven Effekt von intrazerebroventrikulär appliziertem Baclofen am global-ischämischen 4-Gefäßverschlussmodell der Ratte.

In der Arbeit von Ludolph [4], wo 1,5µg Baclofen bei 250g schweren männlichen Wistar-Ratten 30min präischämisch und in einem anderen Versuchsaarm 30min postischämisch appliziert wurden, zeigt sich ebenfalls kein neuroprotektiver Effekt. Vielmehr gibt es einen an der unteren Grenze zur Signifikanz sich befindlichen schädigenden Einfluss von Baclofen im präischämischen Arm, erklärbar dort mit einem kardiodepressiven und hyperkapnischen Effekt, begleitet von einer respiratorischen Azidose.

Keinen signifikanten Einfluss auf die Zellschädigung hatte dort das postischämisch applizierte Baclofen in derselben Konzentration von 1,5µg/250g KG oder 6µg/kg KG.

Die hieraus gewonnene Konklusion leitete die Fragestellung für diese Arbeit her: Gefragt war nach einer Dosisescalationsuntersuchung während der postischämischen Baclofengabe, um einen möglicherweise vorhandenen neuroprotektiven Effekt bei höherer Dosis zu demaskieren. Umgekehrt bestand die Notwendigkeit, das präischämisch applizierte Baclofen in einer niedrigeren Dosis zu testen, um einen neurotoxischen Effekt auszuschließen.

In der Folge wurden postischämisch statt 6µg/kg KG die erhöhte Dosis von 8µg/kg KG und präischämisch statt 6µg/kg KG nur 4µg/kg KG appliziert. Das Ergebnis ähnelt der Ludolphschen Versuchsserie zunächst sehr: Postischämisch konnte kein signifikanter Einfluss von Baclofen intrathekal auf das Zellschädigungsmuster nachgewiesen werden. Präischämisch zeigte sich eine Aggravation der neuronenschädigenden Wirkung. Zwar kann in der vorliegenden Studie mit reduzierter Dosis der kardiopulmonale Einfluss kontrolliert werden (s. o. bei 3.2 und 3.6 – 3.8), es bleibt aber ein schädigender Einfluss von präischämisch appliziertem Baclofen, der diesmal sogar Signifikanzniveau erreicht ($p=0,021$).

Diesmal sind störende hyperkapnische oder laktatazidotische Begleitumstände ausgeschlossen worden, die das Ergebnis erklären könnten: Diese Effekte sind kontrolliert.

Ausgeschlossen werden kann eine höhere Schädigungsrate durch Glukosedysbalancen, wenngleich im präischämischen Versuch die Kontrollgruppe die geringfügig höheren Blutglukosewerte erreichte: Für eine Zellschädigung können die intraoperativ erhöhten Glukosewerte (s. 3.5) in diesem niedrigen Bereich kaum verantwortlich zeichnen.

Bereits im Methodenteil wurde dargelegt, in welchem Rahmen sich die Blutglukosewerte bewegen müssen, um relevante Aussagen über Schädigungsraten machen zu können. Mit der Berücksichtigung des Einflusses des mittleren arteriellen Blutdruckes sind somit alle erfassten Vital- und Laborparameter betrachtet und diskutiert worden.

Eine Erklärung, warum Baclofen nun präischämisch eine ausgeprägtere und trotz niedrigerer Dosierung sogar eine signifikante Schädigung hervorruft, kann von dem vorliegenden Modell nicht geliefert werden.

5 Zusammenfassung

Baclofen wird als selektiver GABA_B-Rezeptor-Agonist seit über 30 Jahren in der Therapie der zentralen Spastik eingesetzt. Sorgfältige klinische Beobachtungen haben gezeigt, dass die Anwendung dieses Pharmakons durchaus Effekte zeigt, die mit einer neuroprotektiven Potenz vereinbar sind. Auf dem Boden der Exzitotoxizitätstheorie mit einer verminderten Ausschüttung von Ca²⁺ durch die postsynaptische Inhibition und auf Grund der präsynaptischen, G-Protein-gekoppelten Reduktion des Ca²⁺-Influxes ist diese Wirkung erklärbar.

Eine dieser Arbeit vorausgehende Untersuchung zeigte bei 30min prä- und 30min postischämischer intrathekaler Baclofenapplikation von 6µg/kg KG keine Wirksamkeit hinsichtlich des Endpunktes einer gegenüber einer Kontrollgruppe verminderten Zahl an geschädigten Neuronen im hippocampalen CA1-Areal. Die Ischämiezeit betrug 10min, und bei der präischämischen Applikation zeigte sich sogar eine beinahe signifikant erhöhte Zahl an geschädigten Neuronen, die dort mit einer respiratorischen Azidose und Hyperkapnie erklärt wurde. Als Konsequenz aus diesen Ergebnissen wurde die vorliegende Dosiseskalationsstudie postischämisch mit identischem Versuchssetting initiiert, um einen möglicherweise doch noch vorhandenen neuroprotektiven Effekt bei höherer Dosis nachzuweisen, sowie eine Dosisreduktion zur Vermeidung der negativen respiratorischen Einflüsse.

In beiden Fällen konnte keine Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden: Postischämisch konnte kein signifikanter Unterschied bei der Applikation von 8µg/kg KG bezüglich der Zellschädigung nachgewiesen

werden, Baclofen hat in diesem Setting also weder einen positiven noch einen negativen Effekt.

Präischämisch konnte die fraglich gesteigerte Zellschädigung nicht relativiert werden, vielmehr erreichte die gesteigerte neuronale Schädigung präischämisch in der Verumgruppe in der vorliegenden Arbeit sogar Signifikanzniveau.

Hinsichtlich der Fragestellung kann in therapeutischer Dosierung bei intrathekaler Injektion eine spezifische Baclofen-induzierte Neurotoxizität postischämisch wohl ausgeschlossen werden. Präischämisch muss diese jedoch angenommen werden.

Bei einer therapeutischen intrazerebroventrikulären Injektion gibt es keine Evidenz für eine neuroprotektive Potenz von Baclofen.

6 Literaturverzeichnis, chronologisch

1. Becker, R., et al., *Intrathecal baclofen alleviates autonomic dysfunction in severe brain injury*. J Clin Neurosci 2000. 7(4): p. 316-9.
2. Becker, R., *Habilitationsschrift: Klinische und experimentelle Beiträge zur intrathekalen Baclofenapplikation*. 2000.
3. Abdel-Hamid, K. M. and Tymianski, M., *Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglycemia or to excitotoxins*. J Neurosci, 1997. 17(10): p. 3538-53.
4. Ludolph, A., *Dissertation: Untersuchung neuroprotektiver Effekte der intrathekalen Baclofenapplikation*. 2005.
5. Rosenbaum, D. M., et al., *Baclofen does not protect against cerebral ischemia in rats*. Stroke, 1990, 21(1): p. 138-40.
6. Payan, H. M. and Conrad, J. R., *Carotid ligation in gerbils. Influence of age, sex and gonades*. Stroke, 1977. 8(2): p. 194-6.
7. Pulsinelli, W. A. and Brierley, J. B., *A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat*. Stroke, 1979. 10(3): p. 267-72.
8. Kameyama, M., et al., *A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat-three vessel occlusion model*. Stroke, 1985. 16(3): p. 267-72.
9. Pulsinelli, W. A. and Buchan, A. M., *The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation*. Stroke, 1988. 19(7): p. 913-4.
10. Ginsberg, M. D. and Busto, R., *Rodent models of cerebral ischemia*. Stroke, 1989. 20(12): p. 1627-42.
11. Nagasawa, H. and Kogure, K., *Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion*. Stroke, 1989. 20(8): p. 1037-43.
12. Pluta, R., et al., *Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. Method of induction of clinical death, pathophysiology and cerebrovascular pathology*. Acta Neuropathol (Berl), 1991. 83(1): p. 1-11.
13. Ludolph, A., *4-VOM of the rat for global cerebral ischemia*. Unpublished poster, 2002.

14. Babcock, A. M., et al., *In vivo glutamate neurotoxicity is associated with reductions in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II immunoreactivity*. J Neurosci Res, 1999. 56(1): p. 36-43
15. Belayev, A., et al., *Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats*. Brain Res, 2003. 964(1): p. 121-7.
16. Majno, G. and Joris, I., *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. 146(1): p. 3-15.
17. Kirino, T., *Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia*. Brain Res, 1982. 239(1): p. 57-69.
18. Kirino, T. and Sano, K., *Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus*. Acta Neuropathol (Berl), 1984. 62(3): p. 209-18.
19. Kirino, T., Tamura, A. and Sano, K., *A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus*. Stroke, 1986. 17(3): p. 455-9.
20. Nitatori, T., et al., *Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis*. J Neuosci, 1995. 15(2): p. 1001-11.
21. Walton, M., et al., *Annexin V labels apoptotic neurons following hypoxia-ischemia*. Neuroreport, 1997. 8(18): p. 3871-5.
22. Heron, A., et al., *Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain*. J Neurochem, 1993. 61(5): p. 1973-6.
23. MacManus, J. P., et al., *Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain*. Neurosci Lett, 1993. 164(1-2): p. 89-92.
24. Petito, C. K., et al., *DNA fragmentation follows delayed neuronal death in CA1 neurons exposed to transient global ischemia in the rat*. J Cereb Blood Flow Metab, 1997. 17(9): p. 967-76.
25. Colbourne, F., Sutherland, G. R. and Auer, R. N., *Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia*. J Neurosci, 1999. 19(11): p. 42100-10.
26. Li, Y., et al., *Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats*. Stroke, 1995. 26(7): p. 1252-8.
27. Smith, M. L., Auer, R. N., Siesjo, B. K., *The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia*. Acta Neuropathol (Berl), 1984. 64 (4): p. 319-32.

28. Van Reempts, J., *The hypoxic brain: histological and ultrastructural aspects*. Behav Brain Res, 1984. 14(2): p. 99-108.
29. Mennel, H. D., et al., *Morphology of tissue damage due to experimental cerebral ischemia in rats*. Exp Pathol, 1988. 35(4) p. 219-30.
30. Benveniste, H., et al., *Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis*. J Neurochem, 1984. 43(5): p. 1369-74.
31. Wahlestedt, C., et al., *Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischemic infarctions*. Nature, 1993. 363(6426): p. 260-3.
32. Obrenovitch, T. P., Richards, D. A., *Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischemia*. Cerebrovasc Brain Metab Rev, 1995. 7(1): p. 1-54.
33. Martin, L. J., et al., *Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis*. Brain Res Bull, 1998. 46(4): p. 281-309.
34. Nicholls, D. G., Budd, S. L., *Neuronal excitotoxicity: the role of mitochondria*. Biofactors, 1998. 8(3-4): p. 287-99.
35. Benveniste, H., et al., *Calcium accommodation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia*. Acta Neurol Scand, 1988. 78(6): p. 529-36.
36. Somjen, G. G., et al., *Spreading depression-like depolarization and selective vulnerability of neurons. A brief review*. Stroke, 1990. 21(11 suppl): p. III 179-83.
37. Benveniste, H., et al., *Ischemic damage in hippocampal CA1 is dependent on glutamate release and intact innervation from CA3*. J Cereb Blood Flow Metab, 1989. 9(5): p. 629-39.
38. Nixon, R. A. and Cataldo, A. M., *The lysosomal system in neuronal cell death: a review*. Ann N Y Acad Sci, 1993. 679: p. 87-109.
39. Cotran, S., Kumar, V. and Collins, T., *Robbins pathologic basis of disease*. 7th ed Vol. 1. 1999, Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company. 1425.
40. Sakhi, S., et al., *p53 induction is associated with neuronal damage in the central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(16): p. 7525-9.
41. Xu, Z. C. and Pulsinelli, W. A., *Responses of CA1 pyramidal neurons in rat hippocampus to transient forebrain ischemia: an in vivo intracellular recording study*. Neurosci Lett, 1994. 171(1-2): p. 187-91.

42. Hill, D. R. and Bowery, N. G., *3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain*. *Nature*, 1981. 290(5802): p. 149-52.
43. Nicoll, R. A., Malenka, R. C. and Kauer, J. A., *Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system*. *Physiol Rev*, 1990. 70(2): p. 513-65.
44. Nicoll, R. A., *My close encounter with GABA B receptors*. *Biochem Pharmacol*, 2004. 68(8): p. 1667-74.
45. Poncer, J. C., et al., *Differential control of GABA release at synapses from distinct interneurons in rat hippocampus*. *J. Physiol*, 2000. 528(1): p. 123-30.
46. Olpe, H. R., et al., *The biological activity of d- and l-baclofen (Lioresal)*. *Eur J Pharmacol*, 1978. 52(1): p. 133-6.
47. Ault, B. and Nadler, J. V., *Baclofen selectively inhibits transmission at synapses made by axons of CA3 pyramidal cells in hippocampal slice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1982. 223(2): p. 291-7.
48. Lehmann, A., et al., *Effects of repeated administration of baclofen to rats on GABA B receptor binding sites and subunit expression in the brain*. *Neurochem Res*, 2003. 28(2): p. 387-93.
49. Sallerin, B. and Lazorthes, Y., *Intrathecal baclofen. Experimental and pharmacokinetic studies*. *Neurochirurgie*, 2003. 49(2-3 Pt 2): p. 271-5.
50. Kroin, J. S., et al., *Reduced spinal reflexes following intrathecal baclofen in the rabbit*. *Exp Brain Res*, 1984. 54(1): p. 191-4.
51. Marshall, F. H., et al., *GABA B receptors – the first 7TM heterodimers*. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. 20(10): p. 396-9.
52. Couve, A., Moss, S. J. and Pangalos, M. N., *GABA B receptors: a new paradigm in G protein signalling*. *Mol Cell Neurosci*, 2000. 16(4): p. 296-312.
53. Bowery, N. G., et al., *International Union of Pharmacology. XXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid (B) receptors: structure and function*. *Pharmacol Rev*, 2002. 54(2): p. 247-64.
54. Price, G. W., Kelly, J. S. and Bowery, N. G., *The location of GABA B receptor binding sites in mammalian spinal cord*. *Synapse*, 1987. 1(6): p. 530-8.
55. Bowery, N. G., Hudson, A. L. and Price, G. W., *GABA A and GABA B receptor site distribution in the rat central nervous system*. *Neuroscience*, 1987. 20(2): p. 365-83.

56. Chu, D. C., et al., *Distribution and kinetics of GABA B binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study*. Neuroscience, 1990. 34(2): p. 341-57.
57. Wahlgren, N. G. and Ahmed, N., *Neuroprotection in cerebral ischemia. Facts and fancies – the need for new approaches*. Cerebrovascular Disease, 2004. 17(Suppl 1): p. 153-66.
58. Auer, R. N., *Effect of age and sex on N-methyl-D-aspartate antagonist-induced neuronal necrosis in rats*. Stroke, 1996. 27(4): p. 743-6.
59. Paxinos, G. and Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 1986, New York, Sydney: Academic Press, Inc.
60. Freund, T. F., et al., *Hippocampal cell death following ischemia: effects of brain temperature and anesthesia*. Exp Neurol, 1990. 108(3): p. 251-60.
61. Verhaegen, M., Iaizzo, P. A. and Todd, M. M., *A comparison of the effects of hypothermia, pentobarbital, and isoflurane on cerebral energy stores at the time of ischemic depolarization*. Anesthesiology, 1995. 82(5): p. 1209-15.
62. Trippodo, N. C., Yamamoto, J. and Frolich, E. D., *Whole body venous capacity and effective total tissue compliance in SHR*. Hypertension, 1981. 3(1): p. 104-12.
63. Minamisawa, H., Smith, M. L., Siesjo, B. K., *The effect of mild hyperthermia and hypothermia on brain damage following 5, 10, and 15 minutes of forebrain ischemia*. Ann Neuro., 1990. 28(1): p. 26-33.
64. Minamisawa, H., et al., *Preservation of brain temperature during ischemia in rats*. Stroke, 1990. 21(5): p. 758-64.
65. Minamisawa, H., et al., *The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damages*. J Cereb Blood Flow Metab, 1990. 10(3): p. 365-75.
66. Miyazawa, T. et al., *Heating of the brain to maintain normothermia during ischemia aggravates brain injury in the rat*. Acta Neuropathol (Berl), 1993. 85(5): p. 488-94.
67. Asai, S., et al., *Minimal effect of brain temperature changes on glutamate release in rat hippocampus following severe global brain ischemia: a dialysis electrode study*. Neuroreport, 1998. 9(17): p. 3863-8.
68. Baena, R. C., et al., *Hyperthermia delayed by 24 hours aggravates neuronal damage in rat hippocampus following global ischemia*. Neurology, 1997. 48(3): p. 768-73.

69. Kim, Y., et al., *Delayed postischemic hyperthermia in awake rats worsens the histopathological outcome of transient focal cerebral ischemia*. *Stroke*, 1996. 27(12): p. 2274-80; discussion 2281.
70. Mitani, A. and Kataoka, K., *Critical levels of extracellular glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hyperthermia: brain microdialysis study*. *Neuroscience*, 1991. 42(3): p. 661-70.
71. Zornow, M. H., *Inhibition of glutamate release: a possible mechanism of hyperthermic neuroprotection*. *J Neurosurg Anesthesiol*, 1995. 7(2): p. 148-51.
72. Dietrich, W. D., et al., *The importance of brain temperature in alterations of the blood-brain barrier following cerebral ischemia*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1990. 49(5): p. 486-97.
73. Baker, A. J., et al., *Hypothermia prevents ischemia-induced increases in hippocampal glycine concentrations in rabbits*. *Stroke*, 1991. 22(5): 666-773.
74. Busto, R., et al., *Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1987. 7(6): p. 729-38.
75. Corbett, D., Nurse, S. and Colbourne, F., *Hypothermic neuroprotection. A global ischemia study using 18- to 20-month-old gerbils*. *Stroke*, 1997. 28(11): p. 2238-42; discussion 2243.
76. Friedman, L. K., et al., *Intraischemic but not postischemic hypothermia prevents non-selective hippocampal downregulation of AMPA and NMDA receptor gene expression after global ischemia*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001. 86(1-2): p. 34-47.
77. Zhang, R. L., et al., *Postischemic (1 hour) hypothermia significantly reduces ischemic cell damage in rats subjected to 2 hours of middle cerebral artery occlusion*. *Stroke*, 1993. 24(8): p. 1235-40.
78. Brambrink, A. L., et al., *Control of brain temperature during experimental global ischemia in rats*. *J Neurosci Methods*, 1999. 92(1-2): p. 111-22.
79. Busto, R., et al., *Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain*. *Stroke*, 1989. 20(7): p. 904-10.
80. de Courten-Myers, G., Myers, R. E., Schoolfield, L., *Hyperglycemia enlarges infarct size in cerebrovascular occlusion in cats*. *Stroke*, 1988. 19(5): p. 623-30.
81. Li, P. A., et al., *The influence of plasma glucose concentrations on ischemic brain damage is a threshold function*. *Neurosci Lett*, 1994. 177(12-): p. 63-5.

82. Pulsinelli, W. A., et al., *Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat*. *Neurology*, 1982. 32(11): p. 1239-46.
83. Ritter, A. M., et al., *Evaluation of carbohydrate-free diet for patients with severe head injury*. *J Neurotrauma*, 1996. 13(8): p. 473-85.
84. Wagner, K. R., et al., *Hyperglycemic versus normoglycemic stroke: topography of brain metabolites, intracellular pH, and infarct size*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1992. 12(2): p. 213-22.
85. Larsen, R., *Anästhesie. 6th ed. Pharmakologische und physiologische Grundlagen, Blutgase*, ed R. Larsen. 1999, München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg. 1350.
86. Romeis, *Mikroskopische Technik. 17. Auflage ed, ed. P. Böck*. 1989, München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg.
87. Burck, H., *Histologische Techniken. 6. unveränderte Auflage ed, ed. H. Burck*. 1988, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
88. Lipton, P., *Ischemic cell death in brain neurons*. *Physiol Rev*, 1999. 79(4): p. 1431-568.
89. Kristian, T. and Siesjö, B. K., *Calcium-related damage in ischemia*. *Life Sci*, 1996. 59(5-6): p. 357-67.
90. Nakamura, T., et al., *Increased intracellular Ca²⁺ concentration in the hippocampal CA1 area during global ischemia and reperfusion in the rat: a possible cause of delayed neuronal death*. *Neuroscience*, 1999. 88(1): 57-67.
91. Gudermann, T., et al., *Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction*. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 1997. 31: p 253-62.
92. Gudermann, T., Nurnberg, B. and Schultz, G., *Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function*. *J Mol Med*, 1995. 73(2): p. 51-63.
93. Gudermann, T., Nurnberg, B. and Schultz, G., *Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function*. *J Mol Med*, 1995. 73(3): p. 123-32.
94. Lobner, D. and Lipton, P., *Intracellular calcium levels and calcium fluxes in the CA1 region of the rat hippocampal slice during in vitro ischemia: relationship to electrophysiological cell damage*. *J Neurosci*, 1993. 13(11): p. 4861-71.
95. Koch, H. J., Szecey, A. and Haen, E., *NMDA-antagonism (memantine): an alternative pharmacological therapeutic principle in Alzheimer's and vascular dementia*. *Curr Pharm Des*, 2004. 10(3): p. 253-9.

96. Hartley, D., et al., *Glutamate receptor induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration*. Journal Neurosci, 1993. 13(5): p. 1993-2000.
97. Olney, J., *Brain-lesions obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate*. Science, 1969. 164: p. 719-21.
98. Ochs, G. A. and Reimann, I. W., *Baclofen Intrathekal – Leitfaden für die praktische Anwendung. 2., vollständig überarbeitete Auflage ed. 2004*, Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag. 120 S., 24 Abb.
99. Li, D. P. and Pan, H. L., *Role of gamma-aminobutyric acid (GABA) A and GABA B receptors in paraventricular nucleus in control of sympathetic vasomotor tone in hypertension*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. 320(2): p. 615-26.

7 Literaturverzeichnis, alphabetisch

- [3] Abdel-Hamid, K. M. and Tymianski, M., *Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglycemia or to excitotoxins*. J Neurosci, 1997. 17(10): p. 3538-53.
- [67] Asai, S., et al., *Minimal effect of brain temperature changes on glutamate release in rat hippocampus following severe global brain ischemia: a dialysis electrode study*. Neuroreport, 1998. 9(17): p. 3863-8.
- [58] Auer, R. N., *Effect of age and sex on N-methyl-D-aspartate antagonist-induced neuronal necrosis in rats*. Stroke, 1996. 27(4): p. 743-6.
- [47] Ault, B. and Nadler, J. V., *Baclofen selectively inhibits transmission at synapses made by axons of CA3 pyramidal cells in hippocampal slice*. J Pharmacol Exp Ther, 1982. 223(2): p. 291-7.
- [14] Babcock, A. M., et al., *In vivo glutamate neurotoxicity is associated with reductions in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II immunoreactivity*. J Neurosci Res, 1999. 56(1): p. 36-43
- [68] Baena, R. C., et al., *Hyperthermia delayed by 24 hours aggravates neuronal damage in rat hippocampus following global ischemia*. Neurology, 1997. 48(3): p. 768-73.
- [73] Baker, A. J., et al., *Hypothermia prevents ischemia-induced increases in hippocampal glycine concentrations in rabbits*. Stroke, 1991. 22(5): 666-773.
- [1] Becker, R., et al., *Intrathecal baclofen alleviates autonomic dysfunction in severe brain injury*. J Clin Neurosci 2000. 7(4): p. 316-9.
- [2] Becker, R., *Habilitationsschrift: Klinische und experimentelle Beiträge zur intrathekalen Baclofenapplikation*. 2000.
- [15] Belayev, A., et al., *Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats*. Brain Res, 2003. 964(1): p. 121-7.
- [35] Benveniste, H., et al., *Calcium accommodation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia*. Acta Neurol Scand, 1988. 78(6): p. 529-36.
- [30] Benveniste, H., et al., *Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis*. J Neurochem, 1984. 43(5): p. 1369-74.
- [37] Benveniste, H., et al., *Ischemic damage in hippocampal CA1 is dependent on glutamate release and intact innervation from CA3*. J Cereb Blood Flow Metab, 1989. 9(5): p. 629-39.

- [53] Bowery, N. G., et al., *International Union of Pharmacology. XXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid (B) receptors: structure and function*. Pharmacol Rev, 2002. 54(2): p. 247-64.
- [55] Bowery, N. G., Hudson, A. L. and Price, G. W., *GABA A and GABA B receptor site distribution in the rat central nervous system*. Neuroscience, 1987. 20(2): p. 365-83.
- [78] Brambrink, A. L., et al., *Control of brain temperature during experimental global ischemia in rats*. J Neurosci Methods, 1999. 92(1-2): p. 111-22.
- [87] Burck, H., *Histologische Techniken. 6. unveränderte Auflage ed*, ed. H. Burck. 1988, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- [79] Busto, R., et al., *Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain*. Stroke, 1989. 20(7): p. 904-10.
- [74] Busto, R., et al., *Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 1987. 7(6): p. 729-38.
- [56] Chu, D. C., et al., *Distribution and kinetics of GABA B binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study*. Neuroscience, 1990. 34(2): p. 341-57.
- [25] Colbourne, F., Sutherland, G. R. and Auer, R. N., *Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia*. J Neurosci, 1999. 19(11): p. 42100-10.
- [75] Corbett, D., Nurse, S. and Colbourne, F., *Hypothermic neuroprotection. A global ischemia study using 18- to 20-month-old gerbils*. Stroke, 1997. 28(11): p. 2238-42; discussion 2243.
- [39] Cotran, S., Kumar, V. and Collins, T., *Robbins pathologic basis of disease*. 7th ed Vol. 1. 1999, Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company. 1425.
- [52] Couve, A., Moss, S. J. and Pangalos, M. N., *GABA B receptors: a new paradigm in G protein signalling*. Mol Cell Neurosci, 2000. 16(4): p. 296-312.
- [80] de Courten-Myers, G., Myers, R. E., Schoolfield, L., *Hyperglycemia enlarges infarct size in cerebrovascular occlusion in cats*. Stroke, 1988. 19(5): p. 623-30.
- [72] Dietrich, W. D., et al., *The importance of brain temperature in alterations of the blood-brain barrier following cerebral ischemia*. J Neuropathol Exp Neurol, 1990. 49(5): p. 486-97.
- [60] Freund, T. F., et al., *Hippocampal cell death following ischemia: effects of brain temperature and anesthesia*. Exp Neurol, 1990. 108(3): p. 251-60.

- [76] Friedman, L. K., et al., *Intraischemic but not postischemic hypothermia prevents non-selective hippocampal downregulation of AMPA and NMDA receptor gene expression after global ischemia*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. 86(1-2): p. 34-47.
- [10] Ginsberg, M. D. and Busto, R., *Rodent models of cerebral ischemia*. Stroke, 1989. 20(12): p. 1627-42.
- [91] Gudermann, T., et al., *Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1997. 31: p 253-62.
- [92] Gudermann, T., Nurnberg, B. and Schultz, G., *Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function*. J Mol Med, 1995. 73(2): p. 51-63.
- [93] Gudermann, T., Nurnberg, B. and Schultz, G., *Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function*. J Mol Med, 1995. 73(3): p. 123-32.
- [96] Hartley, D., et al., *Glutamate receptor induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration*. Journal Neurosci, 1993. 13(5): p. 1993-2000.
- [22] Heron, A., et al., *Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain*. J Neurochem, 1993. 61(5): p. 1973-6.
- [42] Hill, D. R. and Bowery, N. G., *3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain*. Nature, 1981. 290(5802): p. 149-52.
- [8] Kameyama, M., et al., *A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat-three vessel occlusion model*. Stroke, 1985. 16(3): p. 267-72.
- [69] Kim, Y., et al., *Delayed postischemic hyperthermia in awake rats worsens the histopathological outcome of transient focal cerebral ischemia*. Stroke, 1996. 27(12): p. 2274-80; discussion 2281.
- [18] Kirino, T. and Sano, K., *Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus*. Acta Neuropathol (Berl), 1984. 62(3): p. 209-18.
- [17] Kirino, T., *Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia*. Brain Res, 1982. 239(1): p. 57-69.
- [19] Kirino, T., Tamura, A. and Sano, K., *A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus*. Stroke, 1986. 17(3): p. 455-9.
- [95] Koch, H. J., Szecsey, A. and Haen, E., *NMDA-antagonism (memantine): an alternative pharmacological therapeutic principle in Alzheimer's and vascular dementia*. Curr Pharm Des, 2004. 10(3): p. 253-9.

- [89] Kristian, T. and Siesjö, B. K., *Calcium-related damage in ischemia*. Life Sci, 1996. 59(5-6): p. 357-67.
- [50] Kroin, J. S., et al., *Reduced spinal reflexes following intrathecal baclofen in the rabbit*. Exp Brain Res, 1984. 54(1): p. 191-4.
- [85] Larsen, R., *Anästhesie. 6th ed. Pharmakologische und physiologische Grundlagen, Blutgase*, ed R. Larsen. 1999, München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg. 1350.
- [48] Lehmann, A., et al., *Effects of repeated administration of baclofen to rats on GABA B receptor binding sites and subunit expression in the brain*. Neurochem Res, 2003. 28(2): p. 387-93.
- [99] Li, D. P. and Pan, H. L., *Role of gamma-aminobutyric acid (GABA) A and GABA B receptors in paraventricular nucleus in control of sympathetic vasomotor tone in hypertension*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. 320(2): p. 615-26.
- [26] Li, Y., et al., *Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats*. Stroke, 1995. 26(7): p. 1252-8.
- [81] Li, P. A., et al., *The influence of plasma glucose concentrations on ischemic brain damage is a threshold function*. Neurosci Lett, 1994. 177(12-): p. 63-5.
- [88] Lipton, P., *Ischemic cell death in brain neurons*. Physiol Rev, 1999. 79(4): p. 1431-568.
- [94] Lobner, D. and Lipton, P., *Intracellular calcium levels and calcium fluxes in the CA1 region of the rat hippocampal slice during in vitro ischemia: relationship to electrophysiological cell damage*. J Neurosci, 1993. 13(11): p. 4861-71.
- [13] Ludolph, A., 4-VOM of the rat for global cerebral ischemia. Unpublished poster, 2002.
- [4] Ludolph, A., *Dissertation: Untersuchung neuroprotektiver Effekte der intrathekalen Baclofenapplikation*. 2005.
- [23] MacManus, J. P., et al., *Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain*. Neurosci Lett, 1993. 164(1-2): p. 89-92.
- [16] Majno, G. and Joris, I., *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. 146(1): p. 3-15.
- [51] Marshall, F. H., et al., *GABA B receptors – the first 7TM heterodimers*. Trends Pharmacol Sci, 1999. 20(10): p. 396-9.
- [33] Martin, L. J., et al., *Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis*. Brai Res Bull, 1998. 46(4): p. 281-309.

- [29] Mennel, H. D., et al., *Morphology of tissue damage due to experimental cerebral ischemia in rats*. Exp Pathol, 1988. 35(4) p. 219-30.
- [64] Minamisawa, H., et al., *Preservation of brain temperature during ischemia in rats*. Stroke, 1990. 21(5): p. 758-64.
- [65] Minamisawa, H., et al., *The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damages*. J Cereb Blood Flow Metab, 1990. 10(3): p. 365-75.
- [63] Minamisawa, H., Smith, M. L., Siesjo, B. K., *The effect of mild hyperthermia and hypothermia on brain damage following 5, 10, and 15 minutes of forebrain ischemia*. Ann Neuro., 1990. 28(1): p. 26-33.
- [70] Mitani, A. and Kataoka, K., *Critical levels of extracellular glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hyperthermia: brain microdialysis study*. Neuroscience, 1991. 42(3): p. 661-70.
- [66] Miyazawa, T. et al., *Heating of the brain to maintain normothermia during ischemia aggravates brain injury in the rat*. Acta Neuropathol (Berl), 1993. 85(5): p. 488-94.
- [11] Nagasawa, H. and Kogure, K., *Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion*. Stroke, 1989. 20(8): p. 1037-43.
- [90] Nakamura, T., et al., *Increased intracellular Ca^{2+} concentration in the hippocampal CA1 area during global ischemia and reperfusion in the rat: a possible cause of delayed neuronal death*. Neuroscience, 1999. 88(1): 57-67.
- [34] Nicholls, D. G., Budd, S. L., *Neuronal excitotoxicity: the role of mitochondria*. Biofactors, 1998. 8(3-4): p. 287-99.
- [43] Nicoll, R. A., Malenka, R. C. and Kauer, J. A., *Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system*. Physiol Rev, 1990. 70(2): p. 513-65.
- [44] Nicoll, R. A., *My close encounter with GABA B receptors*. Biochem Pharmacol, 2004. 68(8): p. 1667-74.
- [20] Nitatori, T., et al., *Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis*. J Neuosci, 1995. 15(2): p. 1001-11.
- [38] Nixon, R. A. and Cataldo, A. M., *The lysosomal system in neuronal cell death: a review*. Ann N Y Acad Sci, 1993. 679: p. 87-109.
- [32] Obrenovitch, T. P., Richards, D. A., *Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischemia*. Cerebrovasc Brain Metab Rev, 1995. 7(1): p. 1-54.

- [98] Ochs, G. A. and Reimann, I. W., *Baclofen Intrathekal – Leitfaden für die praktische Anwendung. 2., vollständig überarbeitete Auflage ed. 2004*, Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag. 120 S., 24 Abb.
- [97] Olney, J., *Brain-lesions obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate*. Science, 1969. 164: p. 719-21.
- [46] Olpe, H. R., et al., *The biological activity of d- and l-baclofen (Lioresal)*. Eur J Pharmacol, 1978. 52(1): p. 133-6.
- [59] Paxinos, G. and Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 1986, New York, Sydney: Academic Press, Inc.
- [6] Payan, H. M. and Conrad, J. R., *Carotid ligation in gerbils. Influence of age, sex and gonades*. Stroke, 1977. 8(2): p. 194-6.
- [24] Petito, C. K., et al., *DNA fragmentation follows delayed neuronal death in CA1 neurons exposed to transient global ischemia in the rat*. J Cereb Blood Flow Metab, 1997. 17(9): p. 967-76.
- [12] Pluta, R., et al., *Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. Method of induction of clinical death, pathophysiology and cerebrovascular pathology*. Acta Neuropathol (Berl), 1991. 83(1): p. 1-11.
- [45] Poncer, J. C., et al., *Differential control of GABA release at synapses from distinct interneurons in rat hippocampus*. J. Physiol, 2000. 528(1): p. 123-30.
- [54] Price, G. W., Kelly, J. S. and Bowery, N. G., *The location of GABA B receptor binding sites in mammalian spinal cord*. Synapse, 1987. 1(6): p. 530-8.
- [9] Pulsinelli, W. A. and Buchan, A. M., *The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation*. Stroke, 1988. 19(7): p. 913-4.
- [82] Pulsinelli, W. A., et al., *Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat*. Neurology, 1982. 32(11): p. 1239-46.
- [7] Pulsinelli, W. A. and Brierley, J. B., *A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat*. Stroke, 1979. 10(3): p. 267-72.
- [83] Ritter, A. M., et al., *Evaluation of carbohydrate-free diet for patients with severe head injury*. J Neurotrauma, 1996. 13(8): p. 473-85.
- [86] Romeis, *Mikroskopische Technik. 17. Auflage ed, ed. P. Böck*. 1989, München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg. 18. Auflage seit 2010 bei Spektrum verfügbar.
- [5] Rosenbaum, D. M., et al., *Baclofen does not protect against cerebral ischemia in rats*. Stroke, 1990. 21(1): p. 138-40.

- [40] Sakhi, S., et al., *p53 induction is associated with neuronal damage in the central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(16): p. 7525-9.
- [49] Sallerin, B. and Lazorthes, Y., *Intrathecal baclofen. Experimental and pharmacokinetic studies*. Neurochirurgie, 2003. 49(2-3 Pt 2): p. 271-5.
- [27] Smith, M. L., Auer, R. N., Siesjo, B. K., *The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia*. Acta Neuropathol (Berl), 1984. 64 (4): p. 319-32.
- [36] Somjen, G. G., et al., *Spreading depression-like depolarization and selective vulnerability of neurons. A brief review*. Stroke, 1990. 21(11 suppl): p. III 179-83.
- [62] Trippodo, N. C., Yamamoto, J. and Frolich, E. D., *Whole body venous capacity and effective total tissue compliance in SHR*. Hypertension, 1981. 3(1): p. 104-12.
- [28] Van Reempts, J., *The hypoxic brain: histological and ultrastructural aspects*. Behav Brain Res, 1984. 14(2): p. 99-108.
- [61] Verhaegen, M., Iaizzo, P. A. and Todd, M. M., *A comparison of the effects of hypothermia, pentobarbital, and isoflurane on cerebral energy stores at the time of ischemic depolarization*. Anesthesiology, 1995. 82(5): p. 1209-15.
- [84] Wagner, K. R., et al., *Hyperglycemic versus normoglycemic stroke: topography of brain metabolites, intracellular pH, and infarct size*. J Cereb Blood Flow Metab, 1992. 12(2): p. 213-22.
- [31] Wahlestedt, C., et al., *Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischemic infarctions*. Nature, 1993. 363(6426): p. 260-3.
- [57] Wahlgren, N. G. and Ahmed, N., *Neuroprotection in cerebral ischemia. Facts and fancies – the need for new approaches*. Cerebrovascular Disease, 2004. 17(Suppl 1): p. 153-66.
- [21] Walton, M., et al., *Annexin V labels apoptotic neurons following hypoxia-ischemia*. Neuroreport, 1997. 8(18): p. 3871-5.
- [41] Xu, Z. C. and Pulsinelli, W. A., *Responses of CA1 pyramidal neurons in rat hippocampus to transient forebrain ischemia: an in vivo intracellular recording study*. Neurosci Lett, 1994. 171(1-2): p. 187-91.
- [77] Zhang, R. L., et al., *Postischemic (1 hour) hypothermia significantly reduces ischemic cell damage in rats subjected to 2 hours of middle cerebral artery occlusion*. Stroke, 1993. 24(8): p. 1235-40.
- [71] Zornow, M. H., *Inhibition of glutamate release: a possible mechanism of hyperthermic neuroprotection*. J Neurosurg Anesthesiol, 1995. 7(2): p. 148-51.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die im Folgenden in alphabetischer Reihenfolge aufgeführten Abkürzungen verwendet.

°C	Grad Celsius
'	Minute(n)
A.	Arteria, Arterie
Aa.	Arteriae, Arterien
Abb.	Abbildung, Abbildungen
AD	Außendurchmesser
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure; engl. <i>propionic acid</i>
AMPA	AMPA-Rezeptor
BAC	Baclofen
BGA	Blood gas analysis, Blutgasanalyse
Ca ²⁺	Kalziumionen
[Ca ²⁺]	Konzentration von Kalziumionen
CA	Cornu ammonis, Ammonshorn
CCA	Common carotid artery, A. carotis communis
CCAO	Common carotid artery occlusion, Verschluss der CCA
dl	Deziliter
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DND	Delayed neuronal death, verzögerter neuronaler Zelltod
FA	Femoral artery, A. femoralis
G	Gauge, Größe einer Kanüle nach DIN 60917
Gl.	Glandula, Drüse
GluR	Glutamatrezeptor

ID	Innendurchmesser
i. p.	Intraperitoneal
HPLC	High Performance (or Pressure) Liquid Chromatography, Hoch-leistungs (oder –druck-)flüssigkeitschromatografie
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
µg	Mikrogramm
M.	Musculus, Muskel
MABP	Mean arterial blood pressure, mittlerer arterieller Blutdruck
ml	Milliliter
Mm.	Musculi, Muskel
N.	Nervus, Nerv
n	Anzahl
Ncl.	Nucleus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
Nn.	Nervi, Nerven
o. g.	Oben genannt
p. occ.	Post occlusionem, nach Verschluss
PVN	Paraventricular nucleus, Nucleus paraventricularis hypothalami
s. c.	Subkutan
Tab.	Tabelle
V.	Vena, Vene
VA	Vertebral artery, A. vertebralis
VAO	Vertebral artery occlusion, Verschluss der VA
VOM	Vessel occlusion model, Gefäßverschlussmodell

8.2 Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt PD Dr. Ralf Becker, Chefarzt der Klinik für Neurochirurgie in Seesen, der das Thema angeregt und mich während des gesamten Promotionsvorhabens betreut hat. Er ist mir immer ein wichtiger Ansprechpartner gewesen. Mit seinem besonnenen Naturell und seiner gutmütigen Unterstützung ist er für mich zum persönlichen Vorbild geworden.

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. Helmut Bertalanffy, Direktor der Klinik für Vaskuläre Neurochirurgie des International Neuroscience Institute Hannover, der mir durch seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung stets wichtige Anregungen gegeben und seinerzeit als Leiter der Klinik für Neurochirurgie in Marburg einen optimalen Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt hat.

Prof. Dr. Mennel, damaliger Leiter der Abteilung für Neuropathologie am Klinikum der Philipps-Universität Marburg, verdanke ich wertvolle Diskussionen und eine gute wissenschaftliche Betreuung. Ich kann mir nur wünschen, dass ich noch lange von seiner Erfahrung werde zehren können.

Dr. Jochen Rohlf's gebührt mein ausdrücklicher Dank für behutsam angebrachte und nachhaltige, stets konstruktive Kritik an meiner wissenschaftlichen Arbeit. Bedeutsame Anstöße über die Wichtigkeit der Sitten in der Medizin verdanke ich ihm.

Prof. Dr. Helmut Sitter von der Abteilung für Theoretische Chirurgie am Klinikum der Philipps-Universität Marburg gilt mein vorzüglicher Dank für die ausgezeichnete Unterstützung bei der statistischen Überprüfung der gewonnenen Daten.

Für die gewissenhafte Einarbeitung und unzählige anregende Gespräche danke ich meinem Kommilitonen Alexander Ludolph, mittlerweile Oberarzt im Zentralinstitut für Diagnostische und

Interventionelle Neuroradiologie im Sana Klinikum Offenbach, den ich als Freund habe gewinnen dürfen.

Auf die unglaubliche Erfahrung von Sabine Jennemann, Daniela Forge, Regina Stöhr, Beate Butler und Marcus Steller vom medizinisch-technischen Personal und der kliniksinternen Abteilung für Datenverarbeitung blicke ich in großer Dankbarkeit zurück ebenso wie auf die Unterstützung, die ich von allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Neurochirurgie der Philipps-Universität zu jedem Zeitpunkt erhalten habe.

Der große Zeitaufwand und das persönliche Engagement vieler Einzelner sind mir teure Geschenke geworden.

Den letzten, aber sicherlich nicht geringsten Dank schulde ich zwei weiteren wichtigen Menschen: Katharina Eitel und meinem Freund Andreas Lachenmaier. Durch Frau Eitels Sichtweise habe ich lernen dürfen, die Menschen ins Licht und die Dinge in Frage zu stellen. Und Herrn Lachenmaiers unsichtbare, aber stets fühlbare Unterstützung verquickt mit unbändiger Heiterkeit hat letztlich zur Fertigstellung dieser Arbeit verholfen.

8.3 Akademische Lehrerinnen und Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer waren im vorklinischen Studienabschnitt die Damen und Herren

Aumüller, Basler, Cetin, Daut, Eilers, Geus, Grzeschik, Hasilik, Hofmann, Kern, Koolman, Lammel, Lang, Lill, Löffler, Müller, Mutters, Röhm, Seitz, Steiniger, Suske, Voigt, Weihe und Westermann aus Marburg an der Lahn,

im klinischen Studienabschnitt die Damen und Herren

Arnold, Austermann, Barth, Baum, Becker, Behr, Benes, Berger, Bertalanffy, Beyer, Bien, Czubayko, Dünne, Eilers, Engenhart-Cabillic, Folz, Fuhrmann, Funck, Geks, Gemsa, Gerdes, Görg, Gotzen, Grimm, Griss, Groß, Gudermann, Happle, Hellwig, Hamer, Hemmer, Hemmeter, Herzum, Hesse, Höffken, Hofmann, Hoyer, Huber, Kuhlmann, Joseph, Klenk, Klose, Köhler, König, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Leppek, Likoyiannis, Lorenz, Lohoff, Maier, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pfab, Ramaswamy, Renschmidt, Renz, Richter, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Stiletto, Schüffel, Schwartz, Schwarz, Sekundo, Sitter, Slenczka, Sommer, Sure, Vogelmeier, Vohland, Wagner, Wakat, Werner, Wulf und Zeiler aus Marburg an der Lahn,

die Herren Hauss, Josten, Meixensberger und Tiemann aus Leipzig,

die Damen und Herren Blumgren, Blomqvist, Bojssen, Fernstad, Goldinger und Nilsson aus Stockholm,

die Damen und Herren Dorsch, Gurney, Howe, Hui, Kefford, Mudaliar und Wilcken aus Sydney

sowie die Herren Tatagiba aus Tübingen und Weber aus Köln.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „**Hat intrathekal appliziertes Baclofen (Lioresal®) einen neuroprotektiven Effekt im 4-Gefäßverschlussmodell der Ratte?**“ in der Klinik für Neurochirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Ralf Becker mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Helmut Bertalanffy ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Köln, 1.3.2015

Florian M. Stubenvoll

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

20. Oktober 2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Ralf Becker

1. Korreferent: Prof. Dr. Dr. Dr. Thomas Meyer